



TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI
Fakulta mechatroniky, informatiky
a mezioborových studií ■

Aplikace tenkých vrstev v medicíně

Diplomová práce

Studijní program: N3942 – Nanotechnologie
Studijní obor: 3942T002 – Nanomateriály
Autor práce: **Bc. Ivan Cícha**
Vedoucí práce: prof. Ing. Petr Louda, CSc.





TECHNICAL UNIVERSITY OF LIBEREC
Faculty of Mechatronics, Informatics
and Interdisciplinary Studies ■

Application of thin films in medicine

Master thesis

Study programme: N3942 – Nanotechnology
Study branch: 3942T002 – Nanomaterials
Author: **Bc. Ivan Cícha**
Supervisor: prof. Ing. Petr Louda, CSc.



ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Ivan Cícha**
Osobní číslo: **M14000212**
Studijní program: **N3942 Nanotechnologie**
Studijní obor: **Nanomateriály**
Název tématu: **Aplikace tenkých vrstev v medicíně**
Zadávací katedra: **Katedra materiálu**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Seznamte se s problematikou tvorby tenkých vrstev
2. Navrhněte vrstvy vhodné pro depozici
3. Provedte depozici tenkých vrstev za různých podmínek
4. Charakterizujte vybrané vlastnosti nanosených tenkých vrstev
5. Na základě výsledků provedte diskuzi

Rozsah grafických prací: dle potřeby
Rozsah pracovní zprávy: 40 - 50 stran
Forma zpracování diplomové práce: tištěná/elektronická
Seznam odborné literatury:

- [1] BLICHARSKI, M. *Inżynieria materiaowa*. Warszawa: Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, 2004. ISBN 83-204-2995-1.
- [2] SEDLÁČEK, V. *Povrchy a povlaky kovů*, Praha: Ediční středisko ČVUT Praha, 1992.
- [3] *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier, 2004, 851 s. ISBN 01-258-2463-7.
- [4] GRABARCZYK, J. *Podstawy syntezy biowarstw węglovych w skaly przemyslowej dla chirurgii kostnej*. Łódź: Politechnika Łódzka, 2012.
- [5] BHUSHAN, Bharat, et al. *Handbook of nanomaterials properties*. Springer Science & Business Media, 2014.

Vedoucí diplomové práce: prof. Ing. Petr Louda, CSc.
Katedra materiálu
Konzultant diplomové práce: Ing. Totka Bakalova, Ph.D.
Katedra materiálu
Ostatní konzultanti: Ing. Lukáš Voleský

Datum zadání diplomové práce: 1. února 2018
Termín odevzdání diplomové práce: 30. dubna 2019

prof. Ing. Zdeněk Plíva, Ph.D.
děkan



prof. Ing. Petr Louda, CSc.
vedoucí katedry

Prohlášení

Byl jsem seznámen s tím, že na mou diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci (TUL) nezasahuje do mých autorských práv užitím mé diplomové práce pro vnitřní potřebu TUL.

Užiji-li diplomovou práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědom povinnosti informovat o této skutečnosti TUL; v tomto případě má TUL právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Diplomovou práci jsem vypracoval samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím mé diplomové práce a konzultantem.

Současně čestně prohlašuji, že tištěná verze práce se shoduje s elektronickou verzí, vloženou do IS STAG.

Datum:

Podpis:

Poděkování

Tímto bych chtěl poděkovat všem, kteří mi byli nápomocni při vypracování této diplomové práce. Chtěl bych poděkovat prof. Ing. Petru Loudovi, CSc. za odborné vedení a cenné rady v průběhu realizace diplomové práce. Také bych chtěl velice poděkovat Ing. Totce Bakalové, Ph.D. za její odbornou pomoc, čas a trpělivost, kterou mi při práci věnovala.

Dále bych také rád poděkoval Ing. Pavlu Kejzlarovi, Ph.D, Bc. Petře Šubrtové a Haně Pohlreichové za jejich spolupráci.

A samozřejmě bych rád poděkoval rodině a kamarádům, kteří mě po celou dobu studia a při vytváření diplomové práci podporovali.

Abstrakt

Tato diplomová práce se zaměřuje na aplikace tenkých vrstev ve zdravotnictví. Teoretická část popisuje materiály, které se ve zdravotnictví využívají, a zabývá se otázkou biokompatibility. Dále je popsáno několik druhů tenkých vrstev, které se ve zdravotnictví využívají, a spolu s nimi i metody depozice tenkých vrstev. Dále je zmíněna jedna z metod hodnocení tenkých vrstev, a to SEM. Na závěr je popsána interakce bakterií s povrchem na úrovni nanometrů. Experimentální část se zaměřuje právě na interakci bakterií s povrchem tenkých vrstev TiCN, které byly deponovány při různých parametrech. Pro tuto práci byly použity dva druhy bakterií, a to *Escherichia Coli* a *Staphylococcus Aureus*. Na závěr byla měřena vyluhovatelnost těchto vrstev. Tedy zjištění, zda se přes vrstvu uvolňují ionty substrátu. Také byla provedena tribologická analýza tenkých vrstev. Nejméně kolonizovaný vzorek byl vzorek 1 ($\text{C}_2\text{H}_2/\text{N}_2$ - 20/160 sccm, -40 V, 85 A). Tento vzorek dopadl nejlépe i v testu vyluhovatelnosti a měl nejmenší koeficient tření.

Klíčová slova

Tenká vrstva, biokompatibilita, TiCN, bakterie, PVD, CVD, sol-gel

Abstract

This diploma thesis focuses on the application of thin layers in medicine. The theoretical part describes the materials used in medicine and deals with the question of biocompatibility. Several types of thin films used in medicine are described, along with thin film deposition methods. One of the thin film evaluation methods, namely SEM, is mentioned. Finally, the interactions of bacteria with nanoscale surface are described. The experimental part focuses on the interaction of bacteria with thin TiCN layer deposited on different parameters. Two types of bacteria were used for this work: *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Finally, the leachability of these layers was measured. That is, determining whether the ions of the substrate are released over the layer and, if so, in what quantities. Tribological analysis of the thin films was also performed. The least colonized sample was sample 1 (C₂H₂/N₂ - 20/160 sccm, -40 V, 85 A). This sample also scored best in the leachability test and had the smallest coefficient of friction

Key words

Thin layer, biocompatibility, TiCN, bacteria, PVD, CVD, sol-gel

Obsah

1	Úvod	14
2	Teoretická část.....	15
2.1	Materiály používané ve medicíně a jejich biokompatibilita	15
2.1.1	Biokompatibilní materiály.....	15
2.1.2	Biokompatibilita.....	16
2.2	Tenké vrstvy využívané v medicíně.....	17
2.2.1	Antimikrobiální vrstvy	18
2.2.2	TiN vrstvy.....	19
2.2.3	TiCN vrstvy	19
2.2.4	DLC vrstvy	20
2.2.5	CrN, CrC a CrCN vrstvy	20
2.3	Metoda sol-gel.....	21
2.4	Vakuové metody depozice tenkých vrstev	23
2.4.1	PVD.....	24
2.4.2	CVD.....	28
2.5	Tribologická analýza.....	29
2.5.1	Ball on Disk.....	29
2.6	Hodnocení vlastností tenkých vrstev	30
2.6.1	SEM (Skenovací elektronový mikroskop)	30
2.7	Interakce bakterií s nanopovrchem	34
2.7.1	Způsob interakce a tvorba biofilmu.....	34
2.7.2	Vliv topografie a chemického složení nanopovrchu na bakteriální reakci	35
3	Experimentální část	37
3.1	Použité vzorky.....	37
3.1.1	Parametry depozice	37
3.2	Chemické složení	37

3.3	Biologická interakce s tenkou vrstvou a její měření	38
3.3.1	Použité bakterie pro experimenty	38
3.3.2	Bakteriální suspenze	39
3.3.3	Příprava a test se suspenzí	39
3.3.4	Stanovení kultivovatelných mikroorganismů	40
3.4	Vyluhovatelnost tenkých vrstev	41
3.4.1	Parametry výluhu	42
3.4.2	Princip použité metody pro analýzu	42
3.5	Kluzné vlastnosti, hodnocení součinitele tření	43
4	Výsledky	45
4.1	Chemické složení vrstev	45
4.2	Biologická interakce s tenkou vrstvou	48
4.2.1	Kontrola Staphylococcus aureus	48
4.2.2	Staphylococcus aureus před vytřepáním	48
4.2.3	Staphylococcus aureus po vytřepání	50
4.2.4	Staphylococcus aureus z kuličky	52
4.2.5	Kontrola Escherichia Coli	54
4.2.6	Escherichia Coli po vytřepání	54
4.3	Vyluhovatelnost	55
4.4	Kluzné vlastnosti, hodnocení součinitele tření	59
5	Diskuze a shrnutí výsledků	60
6	Závěr	65
	Použité zdroje a literatura	66

Seznam obrázků

Obrázek 1 - Schéma přípravy materiálů metodou sol-gel vycházející z alkoxidů [12].....	22
Obrázek 2 - Porovnání jednotlivých metod depozice tenkých vrstev [13]	24
Obrázek 3 - Princip napařování pomocí obloukového výboje [15]	25
Obrázek 4 - Schéma mechanismu odprašování [16].....	26
Obrázek 5 - Princip magnetronového napařování [17]	27
Obrázek 6 - Princip metody Ball on Disk [21]	30
Obrázek 7 - Schéma skenovacího elektronového mikroskopu [23]	31
Obrázek 8 - Detektor AsB (Zeiss) [24]	32
Obrázek 9 - EsB detektor [26]	33
Obrázek 10 - Tvorba biofilmu [28].....	35
Obrázek 11 - Skenovací elektronový mikroskop (Zeiss).....	38
Obrázek 12 - Princip ředění desítkovou řadou [29].....	41
Obrázek 13 - CETR UMI Multi-Specimen Test System Tribometr	43
Obrázek 14 - Substrát při 500násobném zvětšení.....	46
Obrázek 15 - Vzorek 3 při 500násobném zvětšení	46
Obrázek 16 - EDS spektrum vrstvy TiCN vzorku 1	47
Obrázek 17 - EDS spektrum vrstvy TiCN vzorku 7	47
Obrázek 18 - Počet kolonií přímo z kuličky substrátu.....	52
Obrázek 19 - Počet kolonií přímo z kuličky vzorku 5	53

Seznam tabulek

Tabulka 1 - Chemické složení substrátu	37
Tabulka 2 - Parametry depozice jednotlivých vrstev	37
Tabulka 3 - Chemické složení tenkých vrstev	45
Tabulka 4 - Kontrola <i>Staphylococcus aureus</i> po 24 hodinách.....	48
Tabulka 5 - Kontrola <i>Staphylococcus aureus</i> po 48 hodinách.....	48
Tabulka 6 - Počet KTJ/ml u jednotlivých ředění vzorků 1 až 3	49
Tabulka 7 - Počet KTJ/ml u jednotlivých ředění vzorků 4 až 6	49
Tabulka 8 - Počet KTJ/ml u jednotlivých ředění vzorku 7 a substrátu.....	49
Tabulka 9 - Počet KTJ/ml u jednotlivých ředění vzorků 1 až 3	51
Tabulka 10 - Počet KTJ/ml u jednotlivých ředění vzorků 4 až 6	51
Tabulka 11 - Počet KTJ/ml u jednotlivých ředění vzorku 7 a substrátu.....	51
Tabulka 12 - Počet KTJ přímo na jednotlivých vzorcích po vytřepání	53
Tabulka 13 - Kontrola <i>Escherichia Coli</i> po 24 hodinách	54
Tabulka 14 - Obsah železa a manganu ve výluhu po 24 hodinách	55
Tabulka 15 - Obsah železa a manganu ve výluhu po 14 dnech	56
Tabulka 16 - Obsah železa a manganu ve výluhu po 30 dnech	56
Tabulka 17 - Hodnoty součinitele tření jednotlivých vzorků	59
Tabulka 18 - První skupina vzorků	60
Tabulka 19 - Druhá skupina vzorků.....	61
Tabulka 20 - Třetí skupina vzorků.....	62

Seznam grafů

Graf 1 - Porovnání KTJ/ml u jednotlivých duplikátů při 3. ředění před vytřepáním	50
Graf 2 - Porovnání KTJ/ml u nezředěných duplikátů po vytřepání	52
Graf 3 - Porovnání výluhů jednotlivých vzorků pro železo.....	57
Graf 4 - Porovnání výluhů jednotlivých vzorku pro mangan	58
Graf 5- Hodnoty součinitele tření všech vzorků	59

Seznam použitých zkratk

Zkratka/symbol	Jednotka	Popis
PVD	[-]	Fyzikální metoda deponování
CVD	[-]	Chemická metoda deponování
HA	[-]	Hydroxyapatit
PMMA	[-]	Polymetyl metakrylát
TiN	[-]	Nitrid titanu
CrN	[-]	Nitrid chromu
CrC	[-]	Karbid chromu
CrCN	[-]	Karbonitrid chromu
PE CVD	[-]	Plazmou podporované CVD
DLC	[-]	Uhlík podobný diamantu
TiCN	[-]	Karbonitrid titanu
SEM	[-]	Skenovací elektronový mikroskop
AsB	[-]	Detektor zpětně odražených elektronů podle úhlu
EsB	[-]	Detektor zpětně odražených elektronů podle energie
MCF	[-]	McFarland
KTJ	[-]	Kolonie tvořící jednotku
U_{bias}	[V]	Napětí generátoru
$\Phi_{C_2H_2/N_2}$	[sccm]	Průtok acetylenu a dusíku
I_{arc}	[A]	Protékající proud při výboji

1 Úvod

Obor medicíny je jedním z nejdůležitějších oborů vůbec a v posledních letech v něm dochází k velikému pokroku. Jedním z těchto pokroků jsou tenké vrstvy a jejich využití v tomto oboru. V medicíně je cílem tenkých vrstev zlepšit mechanické vlastnosti a hlavně biokompatibilitu materiálu, který povlakujeme. Jedná se hlavně o tělní implantáty a různé pomůcky, které přicházejí do kontaktu s tělem. Těmi jsou myšleny například skalpely, chirurgické nůžky atd. Jde nám o to, aby materiál nevyvolal nějakou nežádoucí reakci při kontaktu s tělem, proto se povrch povlakuje biokompatibilními vrstvami.

Nejčastěji se využívají DLC (uhlíku podobný diamant) vrstvy, ale dále také vrstvy karbonitridu titanu a chromu (TiCN a CrCN). Velmi často využívané vrstvy jsou také vrstvy antimikrobiální. Druhů vrstev je samozřejmě více. Každá vrstva se vyznačuje trochu jinými vlastnostmi, a proto nelze s jistotou použít jeden druh vrstvy na všechny aplikace. Některá vrstva je biokompatibilnější, druhá má lepší mechanické vlastnosti a třetí zase lepší antikorozi vlastnosti. Vrstva by také neměla propouštět ionty substrátu, které by mohly mít negativní dopad na tělo.

Existují tři hlavní vakuové metody depozice tenkých vrstev, jedna fyzikální, druhá chemická. Třetí je spojením první a druhé metody. Tenké vrstvy využívané v medicíně jsou z velké části deponovány pomocí magnetronového napařování a napařování elektrickým obloukem. Také se využívají konvenční metody, z nichž nejčastější je metoda sol-gel.

Jedním z největších aspektů při výběru vrstvy je jejich chemické složení a v některých případech i topografie povrchu. To je ovlivněno parametry depozice vrstev, jako jsou průtok plynů, předpětí, tlak v komoře a doba depozice. Musíme počítat s tím, že tenká vrstva nebude interagovat pouze s lidskou tkání, ale i mikroorganismy, jako jsou například bakterie. Interakce bakterií s povrchem tenké vrstvy není zcela prozkoumána, ale existuje několik aspektů, které podporují nebo potlačují bakteriální kolonizaci. S tím úzce souvisí právě chemické složení povrchu vrstvy a také topografie povrchu, resp. drsnost povrchu. V lidském těle se nachází mnoho bakterií, asi nejznámější z nich je *Escherichia Coli*, která je součástí střevní mikroflóry, a to už od narození, kdy se do těla novorozence dostává přes porodní cesty matky.

2 Teoretická část

2.1 Materiály používané v medicíně a jejich biokompatibilita

Materiály, které se využívají v medicíně, se nazývají biomateriály a mají za úkol nahradit část živého systému nebo jeho určité funkce. Na každý biomateriál jsou kladeny jiné nároky a při výběru musíme hledět na 2 aspekty, a to na materiálové vlastnosti a biologické vlastnosti materiálu. Pokud bychom se zaměřili čistě na inženýrský pohled, u biomateriálu nás zajímají jeho mechanické vlastnosti a změna korozních vlastností a stability povrchu při výrobních úpravách. Z medicínského hlediska je pro biomateriál důležité, jak se chová v biologickém prostředí. [1]

2.1.1 Biokompatibilní materiály

Existuje několik druhů biomateriálů a každý má své uplatnění. Podle potřeb pacienta se používají kloubní náhrady, výztuhy, šrouby, stenty, katetry. Dalším případem využití jsou chirurgické nástroje, které mají jiné nároky než výše jmenované součásti, které se do těla implantují a jsou v neustálém přímém kontaktu s tělem. Biokompatibilní materiály můžeme rozdělit podle charakteru materiálu. [1,2]

2.1.1.1 Kovy a jejich slitiny

Kovové biokompatibilní materiály se uplatní hlavně v chirurgii, hlavně jako implantáty, chirurgické nástroje apod. Nejčastěji používanými materiály jsou:

- Titan a jeho slitiny
- Kobaltové slitiny
- Korozivzdorné oceli
- Slitiny Ni-Ti, Nitinol
- Chromniklové slitiny Ni-Cr [1,2]

2.1.1.2 Keramické materiály

Využití nachází hlavně u dentálních implantátů, a to buď jako nosná konstrukce nebo povlakový materiál kovů. Keramických materiálů je také několik, často se používají:

- Oxidy zirkonu
- Hydroxyapatitová keramika (HA)

- Korund [1]

2.1.1.3 Polymery

Velmi často se používá polyetylen, který se používá při výrobě hadiček katetrů nebo na kloubní povrchy pro totální kyčelní nebo kolenní náhrady. Dalšími využívanými polymery jsou například polymetyl metakrylát (PMMA) nebo teflon a samozřejmě i silikon. Hojně se využívá i kolagen, který je biologicky odbouratelný a své uplatnění nachází hlavně u chirurgických nití a filtrů. [1]

2.1.1.4 Kompozity

Kompozity jsou kombinací dvou materiálů resp. dvou fází. Z tohoto dvoufázového materiálů se vyrábí hlavně dlahy, kostní hřeby a šrouby. Ale své využití nachází i v ortopedii. [1]

2.1.1.5 Uhlíkové materiály

Uhlíkové materiály se používají pro povrchovou úpravu dentálních implantátů. Jsou vysoce bioinertní a mají výhodné mechanické vlastnosti. [1]

2.1.2 Biokompatibilita

Biokompatibilita je obecně nutnou podmínkou rozhodující o tom, zda materiál využijeme, či ne. To platí i pro nástroje, které přijdou s tělem do kontaktu jen na krátkou dobu. Biomateriály se dále dají rozdělit do čtyř skupin, a to podle jejich kompatibility s okolní tkání. [2]

2.1.2.1 Biotolerantní

Jedná se o implantáty, které jsou oddělené od okolní kosti vrstvou jemné tkáně na styčných plochách. Nedochází ke kontaktu při osteogenezi (růst a přestavba kosti v defektu). Vrstva jemné tkáně je přítomna kvůli uvolňujícím se monomerům, iontům a/nebo korozním produktům z implantátu. Do této kategorie biomateriálů spadá většina syntetických polymerů a většina kovů. [2]

2.1.2.2 Bioinertní

Jedná se o implantáty, které jsou v přímém kontaktu s kostní tkání a účastní se osteogeneze. Nicméně, mezi tkání a implantátem nedochází k žádné chemické reakci, což už vyplývá ze samotného názvu této kategorie biomateriálů. Nedochází k

uvolňování žádných prvků. Mezi bioinertní biomateriály patří například hliník, zirkon, titan, tantal, niob a uhlík. [2]

2.1.2.3 Bioaktivní

Mezi implantátem a kostní tkání dochází ke kontaktu a implantát se přímo podílí na osteogenezi. Z kostní tkáně se přímo uvolňují minerály, které se váží k implantátu, což vyvolá osteokondukci (vedení osteogeneze určitým směrem). Do této kategorie biomateriálů spadají: Ca-fosfát, hydroxyapatit a vitro-keramika. [2]

2.1.2.4 Biovstřebatelné

Jedná se o materiály, které se po určité době při kontaktu s tkání rozloží, rozpustí nebo je tělo "zničí" fagocytózou. Velké využití nacházejí u klinických aplikací, kde se nedoporučuje znovu provádět operaci za účelem vyndání implantátu. Pod tuto kategorii spadají fosforečnan vápenatý a kyselina poly-L-mléčná. [2]

2.2 Tenké vrstvy využívané v medicíně

Využití tenkých vrstev nacházíme v biomateriálním inženýrství, a to u lékařských nástrojů, které přicházejí do kontaktu s lidským tělem. Takovéto vrstvy se musejí vyznačovat velkou odolností proti opotřebení, tvrdostí, tažností, biokompatibilitou, biotolerancí a hlavně odolností proti korozi. Vrstvy, které byly deponovány pomocí metody PVD, se vyznačují mnohými kvalitami vhodnými pro biomateriály, včetně dobré biokompatibility. [3]

Velikým tématem je využití tenkých vrstev na kovových implantátech, které jsou ve styku s tělem 24 hodin denně. Tenké vrstvy vytvářejí ochrannou bariéru mezi kovovým implantátem a lidským tělem, čímž chrání živou tkáň před přímým kontaktem s kovem, a zabraňuje tak možné alergické reakci na kovový implantát. Díky tenkým vrstvám můžeme zkombinovat vynikající mechanické vlastnosti kovových sloučenin s optimálními chemickými a biologickými vlastnostmi. Velmi důležitým aspektem je adheze vrstvy k implantátu. I z nepatrné trhliny ve vrstvě se do těla mohou uvolnit kovové ionty. V medicíně se dnes využívá mnoho druhů tenkých vrstev, z nichž každá má různé vlastnosti, proto je výběr vhodné vrstvy velmi důležitý. Na materiály využívané v medicíně jsou kladené vysoké nároky. Nejde jen o biologické vlastnosti, ale i o ty mechanické. Požadavky na biokompatibilní materiály z hlediska medicíny:

- Nesmí docházet ke škodlivé reakci mezi implantátem a okolní tkání;
- Neškodné pro tělo, například nekarcinogenní;
- Netoxické;
- Protialergické;
- Protizánětlivé;
- Chemicky stabilní a inertní. [3]

Požadavky na biokompatibilní materiály z mechanického hlediska:

- Pevnost;
- Odolnost oproti opotřebení;
- Únavová pevnost. [3]

V lidském organismu probíhají elektrochemické reakce, které vytvářejí velmi agresivní prostředí, díky kterému může dojít ke korozi implantovaného materiálu. Proto se využívají materiály s vysokou chemickou stabilitou, jako např. vzácné kovy (elektrochemicky velmi stabilní) a kovy schopné vytvářet vrstvy oxidů (Ti, Cr). Ortopedické implantáty a další různé zdravotnické potřeby jsou povlakovány z různých důvodů. Kromě zvýšení biokompatibility mohou mít také antibakteriální účinek, podporovat růst kosti, zvýšit tvrdost a odolnost oproti opotřebení povrchu nebo zlepšit třecí vlastnosti kloubních dvojic. [3]

2.2.1 Antimikrobiální vrstvy

Antimikrobiální vrstva je připravována nanesením speciálního solu na povrch různých předmětů a materiálů a jeho dopolymerováním tepelně nebo fotochemicky. Výsledná vrstva má prokázanou antibakteriální účinnost. [4]

Nejčastěji se používají nanočástice stříbra, které jsou uchycené na povrchu, avšak nejsou zapuštěny do matrice polymeru. Jako polymer můžeme použít například fosfotriazin. Antimikrobiální aktivita je způsobena uvolňováním stříbrných kationtů, které jsou přitahovány elektronovými donorovými skupinami nacházejícími se v biologických molekulách. V přítomnosti nanočástic stříbra ztrácí DNA biologických molekul schopnost replikace a bílkoviny se stávají neaktivními. Syntéza nanočástic stříbra přímo redukcí polymerním nosičem představuje metodu, při které není potřeba

jiné redukční činidlo. Je založena na redoxní reakci stříbrných kationtů s povrchem, na kterém jsou aminové skupiny. [4]

2.2.2 TiN vrstvy

Tyto vrstvy se nejvíce využívají ve strojním průmyslu, a to hlavně díky odolnosti proti opotřebení, teplotní stabilitě, nízkému koeficientu tření a vysoké tvrdosti. Nicméně, v posledních letech se využívají spíše jako povlaky na ortopedických implantátech, kloubních šroubech a kyčelních náhrad. Je to hlavně díky jejich biokompatibilitě a dobré odolnosti proti korozi, když přijdou do styku s tělními tekutinami. To je způsobeno jejich vysokou chemickou odolností a inertností. TiN vrstvy jsou také biologicky odolné, proto se také využívají ke snížení možnosti infikování z materiálu, který by mohl přijít do kontaktu s lidským tělem. [5,6]

Výhodou těchto vrstev je, že mohou být deponovány na většinu kovů, keramiku a plasty. Také vydrží teploty až do 600 °C a nejsou porézní. [5]

2.2.3 TiCN vrstvy

TiN jsou jedny z nejstudovanějších keramických povlaků, avšak jiné nitridy, jako je právě TiCN, jsou zajímavější alternativou. Tyto vrstvy kombinují vysokou tvrdost a nízký koeficient tření TiC fáze a vysokou pevnost TiN fáze. Tyto jedinečné vlastnosti dělají z TiCN vrstev vhodné kandidáty pro aplikace vyžadující vysokou odolnost proti otěru a opotřebení. V medicíně se využívají hlavně díky svým tribologickým vlastnostem, biokompatibilitě a příznivou cenou. [7,8]

Velikou výhodou těchto vrstev je i jejich adheze k substrátu a možnost depozice na širokou škálu substrátů, jakými jsou například kovy, keramika a plasty. Vrstvy nejsou toxické a využívají se jako povlaky na chirurgických nástrojích. Také vydrží teploty až do 400 °C a nejsou porézní. [7,8]

2.2.4 *DLC vrstvy*

Zkratka DLC znamená v překladu "diamantu podobný uhlík" z anglického diamond-like carbon. Tyto vrstvy se vyznačují vysokou tvrdostí, nízkým koeficientem tření, odolností oproti opotřebení, chemickou inertností, biokompatibilitou atd. Mohou být deponovány na skoro všechny kovy, kovové slitiny a také na nekovové materiály, jako jsou křemík, sklo, keramiky a plasty. Depozice může probíhat při nízkých teplotách substrátu (<200C). [9]

Tyto vrstvy nacházejí velké uplatnění v medicíně, a to díky své biokompatibilitě, jak už bylo zmíněno výše. Zjistilo se, že interakce DLC vrstvy s buňkami makrofágů (bílé krvinky), fibroblastů (základní buňky vazivové tkáně) a osteoblastů (kostní buňky) dopadla pozitivně. Konkrétní případy interakce:

- Na buňkách odebraných z tkáně, která obklopuje DLC vrstvu, nebyly žádné náznaky, že by povlak způsoboval cytotoxicitu.
- DLC povlaky neměly nepříznivý vliv na buněčný metabolismus, konkrétně na produkci tří proteinů specifických pro osteoblasty: alkalická fosfatáza, osteokalcin a kolagen typ I.
- DLC nevyvolávají zánětlivé reakce v buňkách.
- Osteoblasty se dobře šíří na DLC povlaku. [9]

Ukázalo se, že DLC nachází využití i jako povlaky stentů, kyčlí a kloubních náhrad. Zaručují integritu implantátů, zabraňují vytváření nečistot, zamezují nekontrolovatelnému růstu buněk a nezpůsobují žádné infekce. [9]

2.2.5 *CrN, CrC a CrCN vrstvy*

Ukázalo se, že nitridové vrstvy jsou vhodnými kandidáty pro kontakt s kostí, pokožkou a krevní tkání. Navíc vrstvy **CrN** vykazují vysokou stabilitu při sterilizaci párou a autoklávem, tudíž jsou vhodné pro zlepšení nejen mechanických, ale i antikoročních vlastností lékařských nástrojů/zařízení oddělením jejich povrchů od agresivního prostředí v lidském těle. Vrstvy **CrN** jsou také vhodnými kandidáty pro povlakování povrchů umělých kloubů. Nejen že sníží jejich opotřebení, ale také sníží únik kovových iontů z povrchu protézy. Také se ukázalo, že částice **CrN** jsou méně

cytotoxické vůči makrofágům a fibroblastům v porovnání s kovovými (slitina CoCr) částicemi podobné velikosti. [11]

Podobné vlastnosti vykazují i vrstvy **CrCN**, které můžeme taktéž využít na povrchu kloubních náhrad. Vyznačují se ještě lepšími antikorozními vlastnosti než vrstvy CrN. Avšak u těchto vrstev hraje velikou roli substrát, který povlakujeme. Oproti jemným ocelím zlepšuje vysokorychlostních ocel antikorozní vlastnosti. Taktéž se vyznačují menším koeficientem tření, větší tvrdostí a větší odolností proti opotřebení. Přídavek uhlíku zmenšuje zbytkové napětí a zároveň zvyšuje adhezi. [10,11]

Dnešní technologie vyžadují nástroje, které budou umožňovat práci při velkých rychlostech. Tyto požadavky splňují CrC vrstvy. Ty se vyznačují taktéž podobnými vlastnostmi jako předchozí, avšak využívají se spíše na povlakování nástrojů na zpracování hliníkových nebo titanových slitin než v medicíně. [10]

Kvůli vysokým nárokům na povlakování materiálů došlo k intenzivnímu zlepšování PVD technologií. Ukázalo se, že multivrstvy vykazují lepší vlastnosti než monovrstvy. Multivrstvy jsou vytvářeny střídavou depozicí dvou vrstev materiálů s různými vlastnostmi. Tloušťka obou vrstev se pohybuje v řádu nanometrů. Takové vrstvy vykazují dobré mechanické vlastnosti a excelentní odolnost proti korozi a oxidaci, a to lepší jak u monovrstev. [10,11]

2.3 Metoda sol-gel

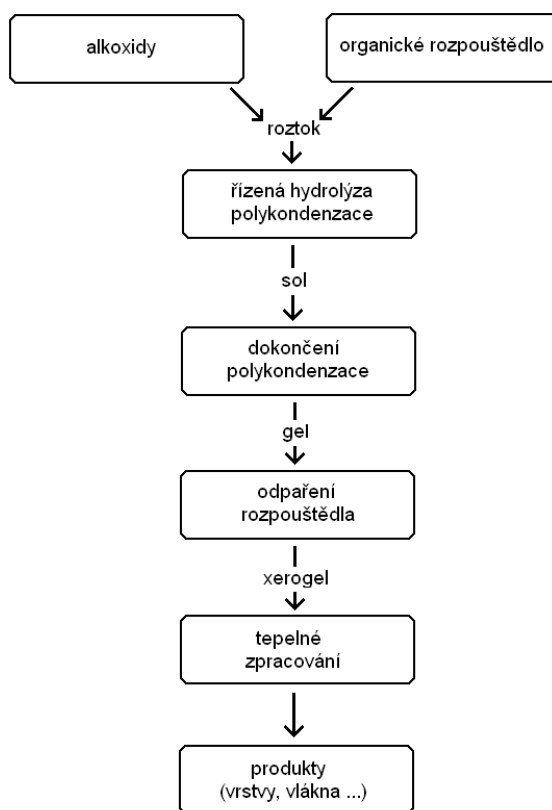
Metoda sol-gel je typicky chemickou metodou přípravy speciálních nekovových materiálů, která má širokou použitelnost v materiálovém inženýrství zvláště pro přípravu vrstev modifikujících fyzikální a chemické vlastnosti různých substrátů. Její význam se stále zvyšuje, protože relativně jednoduchým postupem bez nutnosti velmi nákladných vakuových zařízení lze připravovat širokou škálu tenkých vrstev velmi rozdílného chemického složení. Metoda sol-gel také dovoluje připravit řadu materiálů, které prakticky nelze jinými metodami připravit (anorganicko-organické materiály typu ORMOCER, nanokompozity atd.). [12]

Z hlediska výrobního je velmi důležité, že metoda sol-gel je typickým příkladem flexibilní aplikace s mimořádně vysokou přidanou hodnotou vyžadující hlavně „know-how“. Množství průmyslových aplikací však lze pouze odhadovat, protože mimo

několika desítek firem, které ve svých prospektech uvádějí, že používají metodu sol-gel pro konkrétní výroby, naprostá většina firem neudává způsob výroby svých výrobků. Markantní je to například v mikroelektronice. [12]

Rozvoji metody sol-gel předcházela řada prací z oblasti koloidní chemie, přípravy a vlastností silikagelu a krystalizace amorfních sraženin. První praktické využití principů metody sol-gel bylo již v minulosti při přípravě silikagelu. První patent na přípravu oxidových vrstev touto metodou pochází z roku 1939 a chránil postup výroby antireflexních vrstev na fotografické čočky. [12]

Metoda sol-gel je souborem příbuzných postupů, jejichž společným znakem je homogenizace výchozích složek v roztoku. Základní schéma přípravy materiálů vycházející z alkoxidů je uvedeno na obrázku 1.



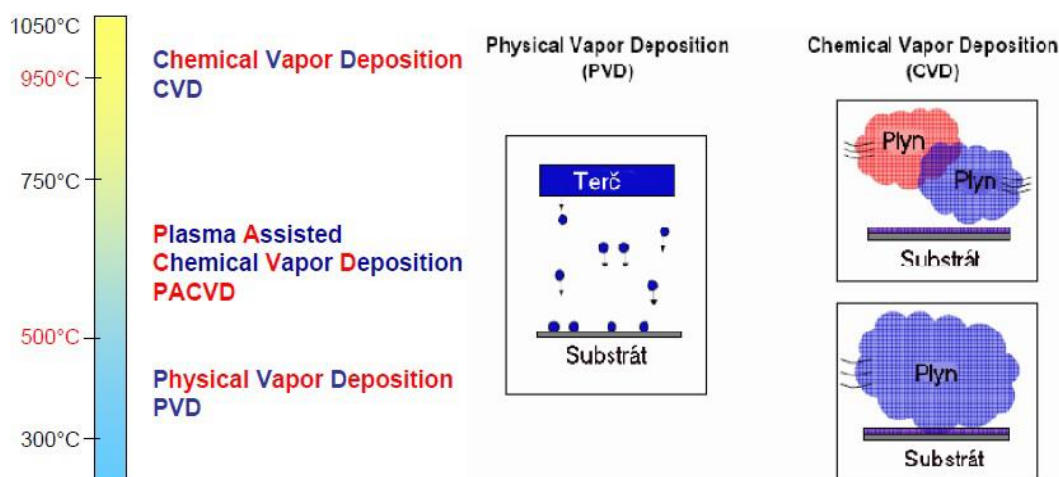
Obrázek 1 - Schéma přípravy materiálů metodou sol-gel vycházející z alkoxidů [12]

Prvním krokem přípravy je rozpuštění alkoxidů požadovaných prvků v bezvodém organickém rozpouštědle za vzniku pravého roztoku. Přidáním vypočítaného

množství vody a katalyzátoru (kyseliny nebo zásady) je řízenou hydrolýzou a současně probíhající polykondenzací připraven sol (koloidní roztok). Pokud jsou výslednou formou vrstvy, je sol některou z technik (vytahování - dip coating, odstředování - spin coating) nanesen na substrát a převeden na gel dokončením polykondenzace v důsledku působení vlhkosti z okolí a částečného odpaření rozpouštědla. Při následném tepelném zpracování dojde k úplnému odpaření rozpouštědla a vzniklý xerogel je převeden při teplotách kolem nebo mírně nad transformační teplotou t_g odpovídajícího skla (t_g je charakteristická teplota v intervalu přeměny skla jako tuhé látky na sklovinu jako vysoce viskózní kapalinu) nebo při teplotě krystalizace na výsledný produkt. V případě přípravy vláken přechází sol při zvlákňování na gel a následně na xerogel a produkt rychlým odpařením rozpouštědla při tepelném zpracování. Při přípravě monolitických vzorků se sol nalije do formy vhodného tvaru, po převedení na gel a částečném vysušení se opatrně vyjme z formy a velmi pomalu převede na xerogel vysušením. Následující zhutnění vyžaduje velmi přesné dodržování optimálního programu při tepelném zpracování, jinak dojde k prasknutí vzorku. Prášky se většinou připravují rychlým usušením rozprášeného solu nebo speciálními postupy. V případě anorganicko-organických materiálů může být zhutnění dokončeno i chemickou polymerací vhodných organických reaktivních skupin teplem, UV zářením nebo katalyzátorem. [12]

2.4 Vakuové metody depozice tenkých vrstev

Depozičních technologií existuje hned několik, avšak lze je rozdělit do tří kategorií, přičemž ta třetí je kombinací dvou předešlých. Na obrázku 2 můžeme vidět porovnání těchto metod depozice tenkých vrstev z hlediska teplot, při které dochází k depozici. První metoda je čistě fyzikální rázu a je obecně známa jako fyzikální depozice z plynné fáze (anglicky Physical Vapor Deposition, zkratka PVD). Tou druhou je metoda čistě chemického rázu, která je známa jako chemická depozice z plynné fáze (anglicky Chemical Vapor Deposition, zkratka CVD). Třetí metodou je PECVD.[13]



Obrázek 2 - Porovnání jednotlivých metod depozice tenkých vrstev [13]

2.4.1 PVD

Tato metoda je jednou ze dvou nejběžněji používaných vakuových depozičních metod. PVD je zkratka pro physical vapor deposition, tedy fyzikální depozice z plynné fáze. Principem je kondenzace kovových par na substrát, který chceme povlakovat. Tuto metodu lze rozdělit na napařování a naprašování. [13]

PVD povlaky nabízejí výhody, které nelze dosáhnout pomocí jiných procesů. Např. kontrola na atomární úrovni, která umožňuje přesně stanovit vlastnosti vrstvy, jako jsou stechiometrie, čírost a rovnoměrné rozložení na substrátu. Ve vrstvě je i obecně méně defektů než u vrstev deponovaných pomocí jiné metody. [13]

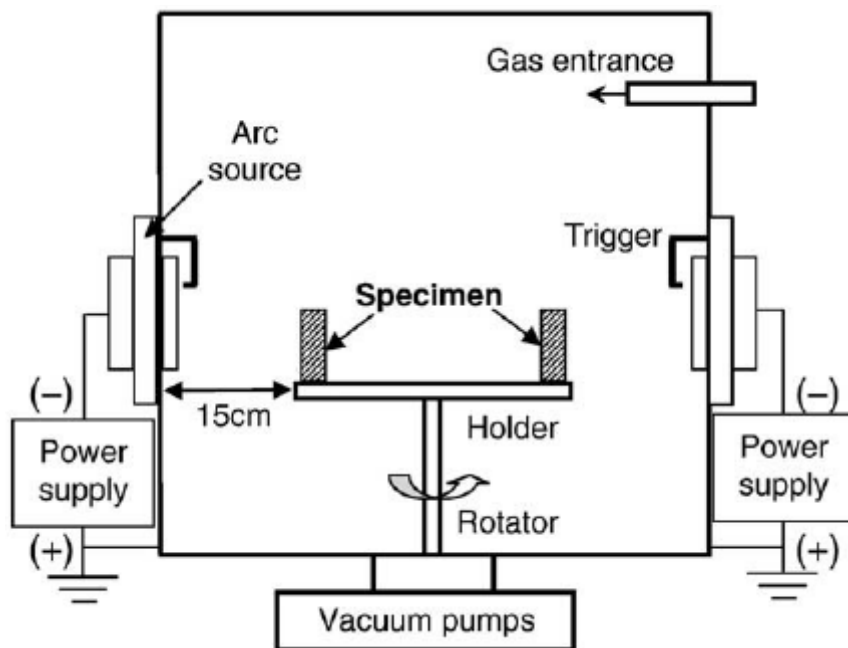
2.4.1.1 Napařování

Základem je odpařování materiálu ve vakuu a následné kondenzaci jeho par na chladnějším povrchu substrátu. K odpaření částic se používá vysoké vakuum, a to z důvodu vysoké teploty varu při atmosférickém tlaku použitých materiálů. Páry se ve vysokém vakuu šíří od svého zdroje přímočaře k substrátu, a to díky molekulárnímu proudění. [13,14]

2.4.1.1.1 Napařování pomocí obloukového výboje

Jednou z nejběžněji používaných depozičních metod je napařování pomocí obloukového výboje (**Cathodic Arc Evaporation**). Principem této metody je elektrický výboj mezi dvěma elektrodami. Tento proud se hromadí na malých ploškách katody, což způsobuje extrémně velkou hustotu proudu (10^{13} W/m^2). Těmto ploškám se říká "katodové tečky". Díky vysoké hustotě proudu dochází k přeměně pevného terče

(materiál, ze kterého je složená katoda) na skoro plně ionizovanou depoziční plazmu. Tato plazma se velmi rychle šíří do okolního vakua směrem k záporně nabitému, rotujícím substrátu. Celý proces se dá kontrolovat pomocí magnetického pole, což má za následek přesunutí depozičního materiálu blíže k substrátu. Tento princip je znázorněn na obrázku 3. [10]



Obrázek 3 - Princip napařování pomocí obloukového výboje [15]

Ionty plazmy mají při depozici kinetickou energii 20-200 eV. Spodní energetická hranice se týká především lehkých prvků, horní hranice pak prvků těžkých. V porovnání s napařováním je tato energie velmi vysoká. Energie iontů při napařování je pouze několik eV. [10]

V komoře je v závislosti na tom, které vrstvy chceme vytvářet, různé prostředí. Buď připustíme inertní plyn - argon, který je potřeba při vytváření kovových vrstev, nebo dusík, který je využíván na vrstvy kovových nitridů. Přechodné vrstvy kovových nitridů se vyznačují vysokou tvrdostí, odolností oproti opotřebení a korozi. Také vykazují excelentní chemickou a tepelnou stabilitu (500-600 °C). Z tohoto důvodu se využívají jako ochranné vrstvy nástrojů a přístrojových částí. [10]

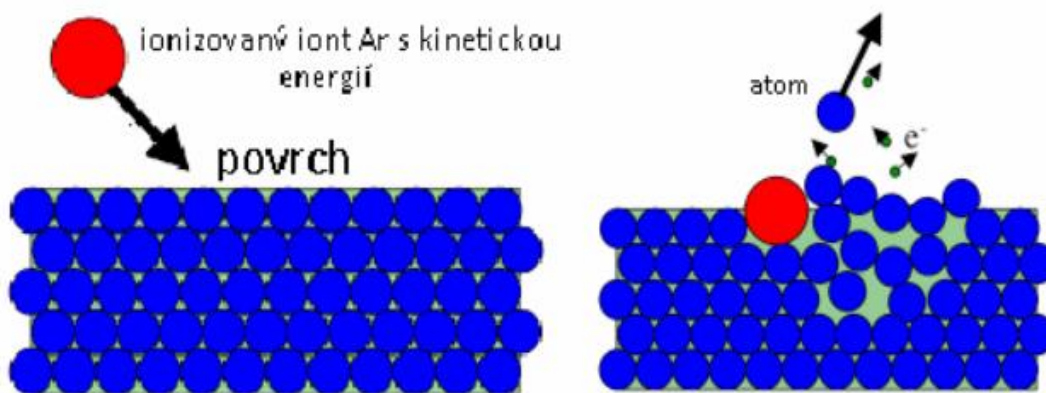
Vrstvy připravené pomocí této metody se vyznačují velkou tvrdostí, vysokou adhezí k substrátu (díky atomům s vysokou energií, které při depozici prorazí povrch, čímž v podstatě ukotví vrstvu), vysokou hustotou, homogenitou a vykazují lepší

vlastnosti než vrstvy připravené pomocí magnetronového naprašování. Tato metoda umožňuje nanášet různé druhy vrstev, a to čisté kovy, kovové karbidy a nitridy. Další výhodou této metody je nízká teplota substrátu. Ionty mají natolik vysokou energii, že nepotřebují tepelnou energii ze substrátu, aby vytvořily husté a kompaktní povlaky. [10]

Nicméně, nevýhodou těchto vrstev je jejich sloupcovitá struktura a přítomnost mikropórů mezi sloupci. Další nevýhodou je výskyt mikročástic (kovové kapičky vytržené z katody) v celém obsahu vrstvy. Výskyt těchto defektů vede k mechanickému poškození vrstvy a odhaluje substrát, který snižuje odolnost vůči korozi povlakovaných částí. [10]

2.4.1.2 Naprašování

Je založeno na rozprašování materiálu katody (terče) energetickými ionty, které jsou urychlovány elektrickým polem, a kondenzací částic odprášeného materiálu na substrátu. Účinkem iontů jsou z terče vytrhávány atomy, které při průchodu oblastí ionizovaného pracovního plynu samy ionizují a dopadají na povrch součástí, které chceme povlakovat. Průběh odprašování materiálu je znázorněn na obrázku 4. [13,14]



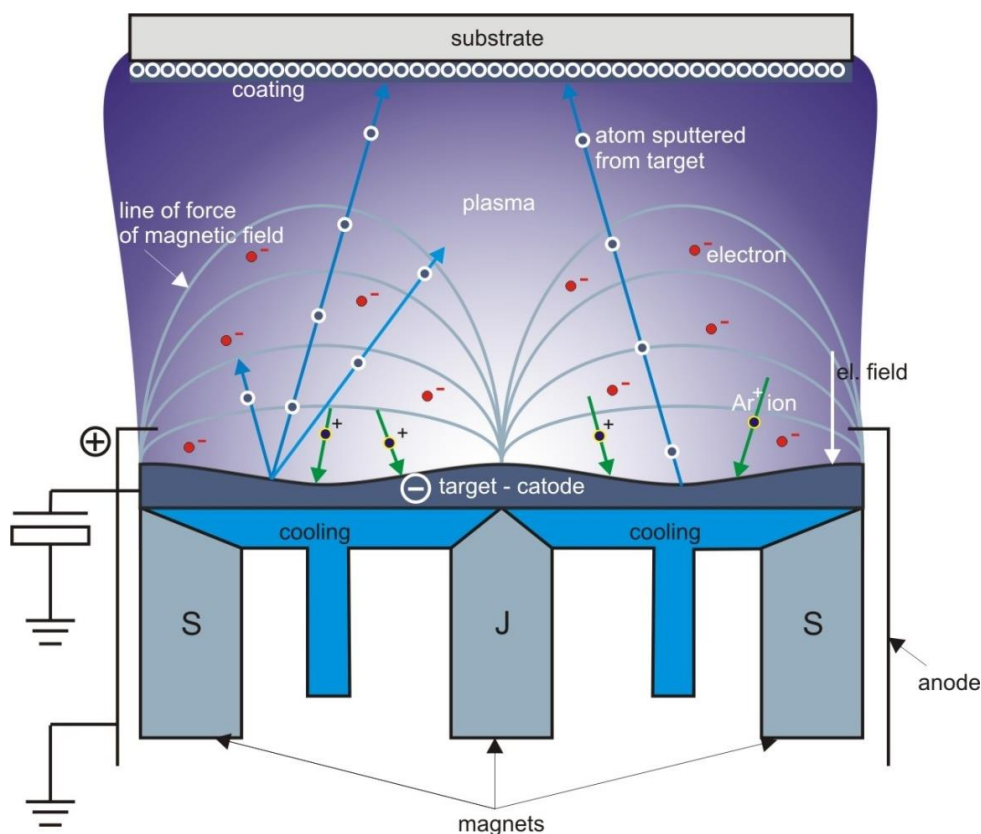
Obrázek 4 - Schéma mechanismu odprašování [16]

Naprašování probíhá v přítomnosti plazmatu, a to buď inertního plynu (depozice vrstev je pak stejného složení, jako má rozprašovaný terč) nebo směsi inertního a reaktivního plynu (reaktivní depozice vrstev různých chemických sloučenin). Z terče se díky iontovému bombardování uvolňují i elektrony, které hrají velkou roli v udržování plazmatu. Výhodou je, že lze odprašovat a ukládat prvky, slitiny a chemické sloučeniny. Depoziční komora může mít malý objem, takže terč a substrát mohou být klidně umístěny blízko sebe, pokud to dovolí velikost vzorku. Proces naprašování je známý už

několik let, avšak má i své nevýhody. Je limitován malou mírou depozice, malou účinností ionizace v plazmě a velkým zahříváním substrátu. Toto se vyřešilo novou, zdokonalenou technologií, které říkáme magnetronové naprašování. [13,14]

2.4.1.2.1 Magnetronové naprašování

Největším rozdílem mezi klasickým naprašováním a magnetronovým naprašováním je přítomnost silného magnetického pole okolo terče. Toto pole způsobuje, že se elektrony pohybují po magnetickém toku poblíž terče místo toho, aby se uvolňovaly k substrátu. Výhodou toho je, že plazma se drží pouze v okolí terče, čímž nijak nepoškozuje vytvářející se tenkou vrstvu. Elektrony také déle setrvávají poblíž terče a zvyšují pravděpodobnost, že dojde k ionizaci dalších atomů pracovního plynu. Díky tomuto procesu je plazma stabilní a s vysokou hustotou iontů. Čím více iontů, tím více atomů se uvolní z terče, a tímvětší je efektivita procesu naprašování. Také čím rychlejší je depozice (rychlost "vytrhávání" atomů z terče), tím méně je nečistot v následně vytvořené tenké vrstvě. Princip této metody je znázorněn na obrázku 5.



Obrázek 5 - Princip magnetronového naprašování [17]

2.4.2 CVD

Tato metoda je spolu s PVD jednou z nejběžněji používaných metod k depozici tenké vrstvy. Zásadní rozdíl mezi CVD (Chemical Vapor Deposition) a PVD je ve způsobu přípravy tenké vrstvy. U metody PVD je to z pevného terče, kdežto u této metody je to z plynu. [13]

Principem této metody jsou chemické reakce, které probíhají v objemu plazmatu a přímo na rozhraní mezi plazmatem a povrchem substrátu. Jak již bylo řečeno výše, reakční složky jsou přiváděny v plynné fázi. Ty se rozkládají za vysokých teplot a vrstva vzniká na povrchu substrátu heterogenní reakcí. [13]

Výhodou této metody jsou relativně nízké náklady na zařízení a řízení procesu. Další výhodou je vysoká teplotní stabilita vytvořených vrstev a možnost vytvářet poměrně složité vrstvy. [13]

Největší nevýhodou této metody je depoziční teplota (950 - 1050 °C). Omezený je tedy i výběr substrátu, který chceme touto metodou povlakovat, jinak by mohlo dojít k jeho degradaci. Mezi další nevýhody můžeme zařadit nemožnost přípravy některých typů vrstev kombinací různých typů kovů a tahová pnutí ve vrstvě. [13]

2.4.2.1 PECVD

Princip této metody má základ v CVD, avšak s tím rozdílem, že zde se využívá plazmatu. Pomocí ionizace a aktivace plynné atmosféry v plazmatickém výboji dochází ke zvýšení její energie. Velikou výhodou PECVD (Plasma Enhanced CVD) oproti klasické metodě CVD je, že chemické reakce probíhají při nižších teplotách, tudíž je možné vytvářet vrstvy, které nesnesou vyšší teploty, a stejně tak použít teplotně citlivé materiály. Míra depozice PECVD je větší a mnohem snadněji se kontroluje, protože jsou prekurzory aktivované plazmou reaktivnější a díky zápornému napětí se dá ovládat míra zionizovaných prekurzorů. [13,18]

Plazma u PECVD je obvykle vyvolána a udržována radiofrekvenčním (RF) nebo mikrovlnným výbojem (MW). Nebo se dají využít i oba výboje naráz. U radiofrekvenčního výboje se frekvence pohybuje od 50 kHz do 13,56 MHz při tlacích 0,1 - 2 Torrů. Hustota plazmy se pohybuje od 10^8 - 10^{12} cm⁻³ a nejrychlejší elektrony mohou mít energii mezi 10 - 30 eV. U mikrovlnného výboje se frekvence pohybuje kolem 2,54

GHz. Hustota plazmy se může za nízkých tlaků pohybovat okolo hodnoty 10^8 cm^{-3} , kdežto za atmosférického tlaku se může vyšplhat až na hodnotu 10^{15} cm^{-3} . [18]

Tenké vrstvy připravené touto metodou nacházejí své uplatnění v biomedicíně. Vrstvy připravené touto metodou bývají zpravidla hemokompatibilní a jsou povrchově stabilní. [18]

2.4.2.2 Epitaxe atomových vrstev

Při tomto procesu jsou do reakční komory přivedeny dva prekursory. Jeden z prekursorů se adsorbuje na povrchu substrátu, ale ke kompletní dekompozici nedojde bez přítomnosti druhého prekursoru. Tato metoda umožňuje dobrou kontrolu kvality u vznikající vrstvy. [19]

Vrstvy připravené touto metodou jsou příznivé pro biomedicínské aplikace. Díky velmi tenkým vrstvám, které nám epitaxe atomových vrstev umožňují, je možné zahladit defekty na povrchu, což zlepšuje korozní vlastnosti materiálu či jiné vrstvy. Ukázalo se, že je tato metoda vhodná i pro povlakování stentů z nerezové oceli a jiných implantátů a mají obecně větší biokompatibilitu, což platí hlavně pro hydroxyapatitové vrstvy. [19]

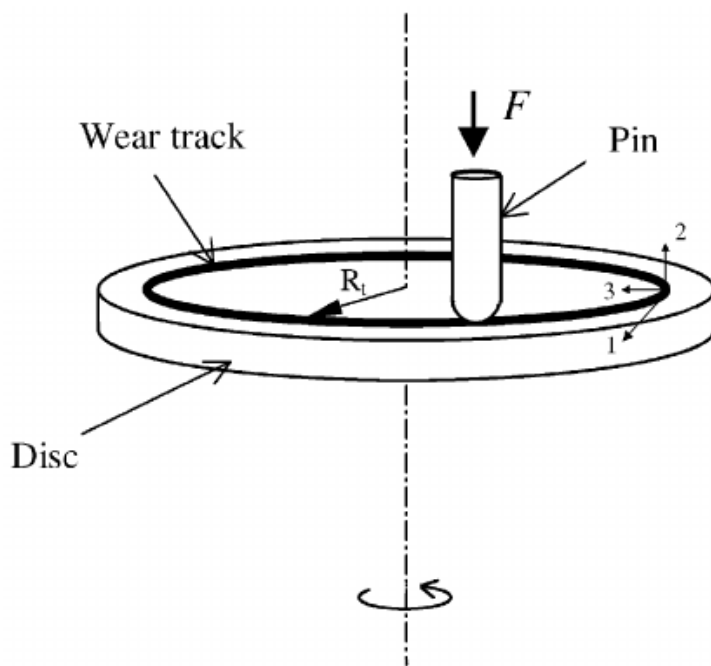
2.5 Tribologická analýza

Tribologické zkoušky se zaměřují na určení součinitele tření μ a jeho změny v průběhu zkoušky pro kombinaci dvou materiálů - hodnocené tenké vrstvy a tělíska specifických vlastností a rozměrů. Metody zjišťování tribologických vlastností lze rozdělit dle druhu vzájemného pohybu zkoumaného materiálu a působícího tělíska, způsobu styku a geometrického tvaru tělíska. Jednou z velmi často aplikovaných metod zjišťování tribologických vlastností je Ball on Disk test. [20]

2.5.1 Ball on Disk

Principem této metody je, že na povrchu vzorku je v určité vzdálenosti od jeho středu přitlačováno konstantní silou zkušební tělísko - pin ve formě pevně uchycené kuličky nebo hrotu. Vzorek se otáčí předem zvolenými otáčkami a vykonává předem definovaný počet kol. Ball (kulička) tak vytvoří na povrchu vzorku stopu, jež je analyzována. Názorný princip této metody je zobrazen na obrázku 6. Výsledky testu jsou ovlivněny několika faktory. Jde o zatěžující sílu, velikost stykové plochy -

geometrie pin tělíska, počet kol, teplota povrchu vzorku, relativní rychlost pohybu mezi kuličkou a vzorkem, použití určitého prostředí - mazací látky, mechanické a fyzikální vlastnosti materiálu vzorku i kuličky a stav a kvalita povrchu vzorku. [20]



Obrázek 6 - Princip metody Ball on Disk [21]

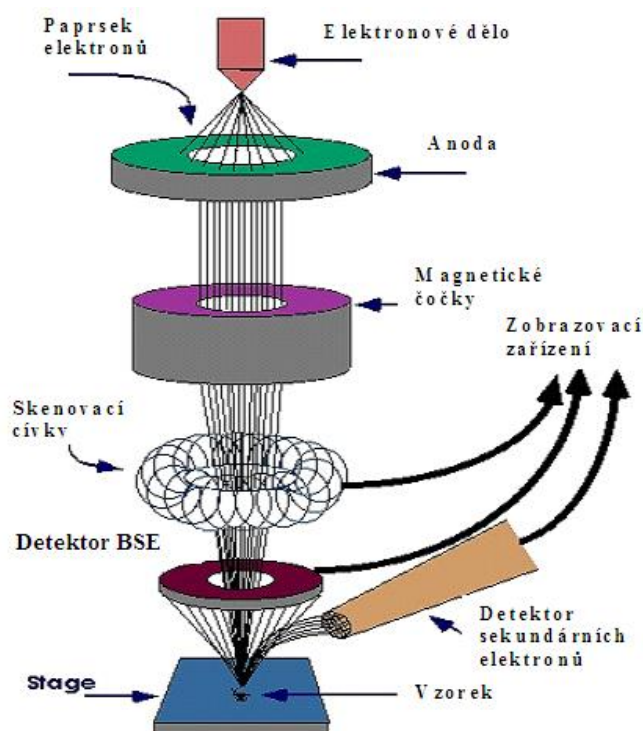
2.6 Hodnocení vlastností tenkých vrstev

2.6.1 SEM (*Skenovací elektronový mikroskop*)

Tento mikroskop funguje na principu detekce sekundárních elektronů a zpětně odražených elektronů. Sekundární elektrony jsou takové elektrony, které byly z atomu vyraženy jiným elektronem s vysokou energií. Tyto elektrony, které jsou zodpovědné za vyražení sekundárních elektronů, jsou urychlovány napětím, které se pohybuje v řádu kilovoltů. Díky této metodě můžeme zjistit topografii povrchu z topografického kontrastu. Vzhledem k tomu, že mají sekundární elektrony nízkou energii, dostane se jich z vyvýšenin na povrchu preparátu do detektoru více. Výsledkem je pak vyšší intenzita signálu, a na obrazovce se tedy jeví světle. U prohlubenin je tomu přesně naopak. Takto vzniká, již zmíněný, topografický kontrast. Sekundární elektrony nejsou jediné elektrony, které dokáže tento mikroskop detekovat, je totiž schopný detekovat i

zpětně odražené elektrony. Tyto elektrony nám poskytují informaci o topografii (reliéfu) vzorku a o materiálovém složení. Pomocí zpětně odražených elektronů zjistíme protonové číslo Z . Čím vyšší protonové číslo, tím více je zpětně odražených elektronů. [22]

Zdrojem elektronů je elektronové dělo, které je zapojeno jako katoda. Nejčastěji se používá žhavené wolframové vlákno. Po vystřelení elektronů z katody projdou ke kladné anodě a dále až k magnetické čočce, kde se paprsek fokusuje na námi zkoumaný vzorek. Ještě před dopadem na povrch vzorku je paprsek primárních elektronů rozpořbován vychylovacími cívkami tak, že pokryje řádky - rastruje. Po dopadu primárního svazku elektrony interagují s povrchem, což následně zachycují dva detektory. Detektor sekundárních elektronů a detektor zpětně odražených elektronů. Do celého schéma se počítá i vzorek, který musí být vodivý. V případě, že není, je třeba ho pokrýt malou vrstvičkou kovu v řádech nm. Schéma skenovacího elektronového mikroskopu je znázorněno na obrázku 7. [22]



Obrázek 7 - Schéma skenovacího elektronového mikroskopu [23]

Skenovací elektronový mikroskop (SEM) se využívá k pozorování povrchů nejrůznějších objektů. Vzhledem k tomu, že má velkou hloubku ostrosti, můžeme na fotografiích ze SEM vidět i jisté trojrozměrné aspekty. Další velkou výhodou tohoto mikroskopu je, že v komoře preparátu vzniká při interakci urychlených elektronů s hmotou vzorku kromě již zmíněných signálů (sekundární elektrony a zpětně odražené elektrony) ještě řada dalších. Například rentgenové záření a Augerovy elektrony, které nesou mnoho dalších informací o vzorku. Při jejich detekci je možné určit například prvkové složení preparátu v dané oblasti a při porovnání s vhodným standardem určit i kvantitativní zastoupení jednotlivých prvků. [22]

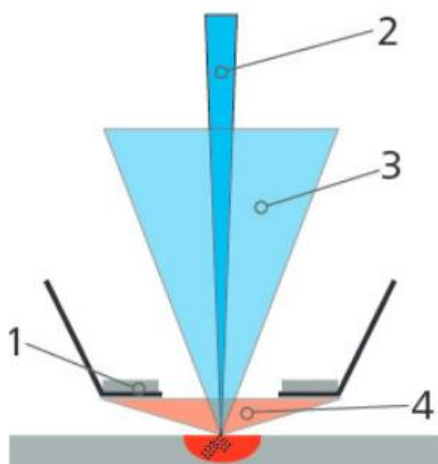
2.6.1.1 Druhy detektorů

2.6.1.1.1 AsB detektor

Tento detektor je umístěn přímo nad vzorkem. Zkratka ASB je odvozena z anglického angle selective backscatter electron. Pomocí tohoto detektoru můžeme zobrazit topografii a materiálový kontrast. Uplatňuje se zde Braggova podmínka:

$$n \cdot \lambda = 2 \cdot d \cdot \sin \theta$$

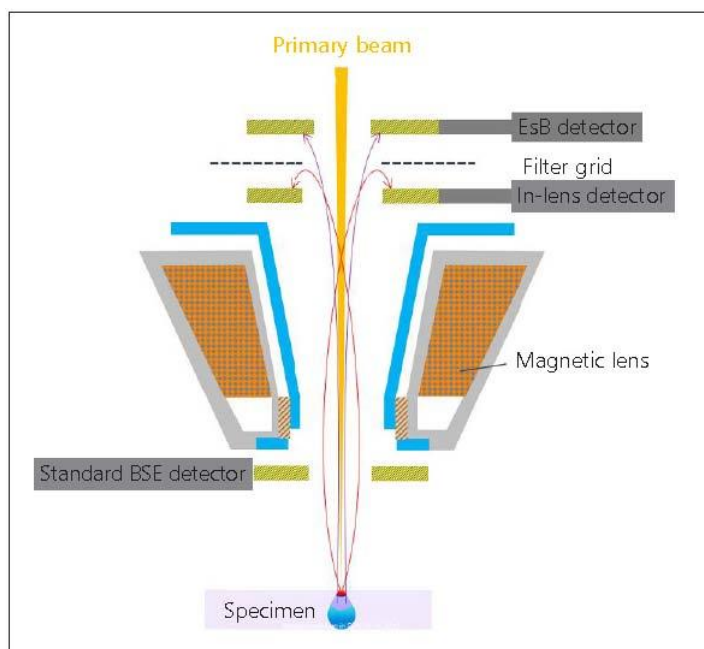
Na monitoru se nám zobrazí jako nejsvětlejší ta místa, kde je právě splněna Braggova podmínka nejlépe. Na obrázku 8 můžeme vidět primární elektronový paprsek (2), integrovaný detektor (1) a také Rutherfordovy zpětně odražené elektrony (3) a Mottoovy zpětně odražené elektrony (4). [24]



Obrázek 8 - Detektor AsB (Zeiss) [24]

2.6.1.1.2 EsB detektor

Z názvu energy selective backscatter electron (ESB) vypovídá, že půjde o detektor, který detekuje určitou energii elektronů. Tento detektor detekuje pouze elektrony, které splňují jisté podmínky. První z podmínek je mřížka, která je před samotným detektorem a je na ni přivedeno určité napětí. Ta slouží jako filtr, tudíž nepropustí elektrony, které mají menší energii, než je přivedené napětí. Druhou podmínkou je urychlovací napětí, které naopak zamezuje elektronům s větší energií, než je toto napětí, vstoupit do detektoru. Detektor tedy zachycuje pouze elektrony s energií vyšší, než je napětí na mřížce, a zároveň energií menší, než je urychlovací napětí. Na obrázku 8 můžeme tento detektor vidět v horní části. [25]



Obrázek 9 - EsB detektor [26]

2.7 Interakce bakterií s nanopovrchem

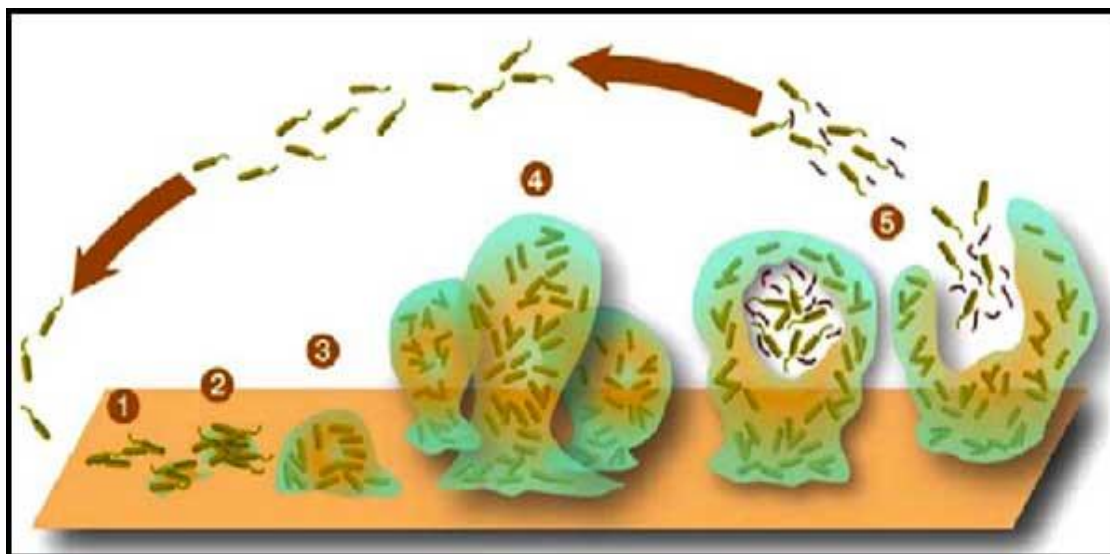
2.7.1 *Způsob interakce a tvorba biofilmu*

Bakterie jsou prokaryotické buňky a liší se od eukaryotických v několika aspektech. Jejich buněčná stěna je, stejně jako u eukaryotických buněk, složena z fosfolipidů, ale ty jsou mnohem pevnější. To je z části způsobeno vnější vrstvou peptidoglykanu, která je u tlustší u grampozitivních bakterií a tenčí u gramnegativních bakterií. Avšak gramnegativní bakterie mají na této tenčí vrstvě ještě jednu vnější vrstvu, a to vrstvu polysacharidu. Bakterie se liší velikostí (od 1 mikronu až po 10 mikronů) a tvarem (kokovitý či tyčinkovitý). Na povrchu bakterií můžeme najít ještě další struktury. Jsou jimi bičíky a pilusy. Bičík slouží k pohybu buňky, zatímco pilus slouží k přichycení buňky k povrchu, tedy adhezi. [27]

Zatímco se jednotlivé buňky mohou připojit k té další nezávisle, u bakterií žijící na povrchu je tomu jinak. Ty žijí jako jeden kmen a vytváří specifickou extracelulární polymerickou substanci (EPS). Takovémuto uskupení bakterií a EPS se říká biofilm. Tvorba a vývoj biofilmu se může lišit v závislosti na biologických vlastnostech přítomné bakterie. Přítomnost přívěsků a specifických receptorů membrány a množství a povaha exopolymerické substance vytvořené bakteriemi jsou příklady faktorů, které vysoce souvisí s kmenem bakterií, a jsou schopné silně ovlivnit adhezi bakterií a tvorbu biofilmu. [27]

Obecně můžeme shrnout tvorbu biofilmu do 4 kroků. Prvním krokem je přivedení bakterie do kontaktu s povrchem. O to se mohou postarat gravitační síly, Brownův pohyb nebo hydrodynamické síly. U některých druhů bakterií může pohyb vyvolat bičík. Druhým krokem při tvorbě biofilmu je adheze bakterií k povrchu. Samotnou adhezi lze rozdělit na dvě fáze. Tou první je vratná adheze a tou druhou nevratná adheze. U těchto dvou fází hrají pravděpodobně velkou roli rozdílné fyzikálně-chemické a chemické interakce bakterií s povrchem. Tyto interakce jsou také silně závislé na vlastnostech povrchu materiálu, na kterém se biofilm vytváří. Tento krok je nejvíce ovlivněn topografií a chemickým složením povrchu. Třetím krokem při tvorbě biofilmu je proliferace adherentních bakterií a, ve většině případů, tvorba matrix biofilmu. Nakonec se stává biofilm takzvaně dozrálý a vykazuje specifický bakteriální metabolismus a fyziologii. Toto je čtvrtý krok při tvorbě biofilmu. V této komunitě spolu bakterie komunikují pomocí organel membrán a biochemických signálů. Na

obrázku můžeme vidět proces vzniku biofilmu, kde pátý krok v podstatě značí první krok popsaný výše. Krok 1 a 2 je znázornění druhého kroku. [27]



Obrázek 10 - Tvorba biofilmu [28]

Dalším důležitým faktorem je způsob, jakým bakterie "vycítí" povrch. Vysvětlení tohoto faktu podporují pouze nepřímé výsledky experimentu. Má se za to, že bakterie jsou schopné využívat molekulárních prvků jejich buněčné membrány jako senzory a vytvářet vnitrobuněčné signální dráhy k vycítění povrchu a k reakci na podněty vytvořené povrchem. Avšak tyto senzory jsou nám zatím neznámé. Nicméně, ukázalo se, že proteinová vrstva na povrchu bakteriální membrány má vliv na adhezi bakterie k povrchu a může také sloužit jako povrchový senzor při kontaktu s povrchem. Tato proteinová vrstva může obsahovat polypeptidy, které hrají roli při adhezi a jsou známy jako "adheziny". [27]

2.7.2 Vliv topografie a chemického složení nanopovrchu na bakteriální reakci

Jak už bylo zmíněno, topografie povrchu by měla mít vliv na uchycení bakterií na povrchu. Na první pohled by se mohlo zdát, že jsou bakterie oproti eukaryotickým buňkám zvýhodněny, protože jsou menší. Nicméně, bakterie mají charakteristický tvar a dají se mnohem méně zdeformovat. A při uchycení k povrchu si ponechají svůj tvar. Tato skutečnost brzdí jakoukoli interakci mezi bakterií a povrchem, tudíž by bakterie neměly být schopné reagovat na topografii povrchu v řádu nanometrů. Některé bakterie

sice mají bičíky nebo řasy, kterými se připojují k povrchu, avšak zatím není důkaz, že by tyto proteinové struktury nějakým způsobem zlepšovaly vazebnou energii s povrchem topograficky strukturovaným v řádu nanometrů. [27]

Bakterie obecně reagují s povrchy topograficky většími, než jsou samotné bakteriální buňky. Přichycují se spíše v trhlínách než na povrchu. Dá se říct, že čím drsnější je povrch, tím více se uchytí bakterií. Díky experimentu interakce bakterií s titanovým povrchem se zjistilo, že nejméně bakterií se vyskytuje na povrchu, který obsahuje díry o průměru 500 nanometrů. Díry o tomto průměru mají pro bakterie, které mají většinou 1 mikrometr v průměru, malou kontaktní plochu. Se zvětšujícím se průměrem děr se zvětšuje i počet bakterií uchycených na povrchu. [27]

Některé studie poukazují na to, že drsnost povrchu nemá na adhezi bakterií tak velký vliv jako chemické složení povrchu. Dá se tedy očekávat, že odpověď bakterie na topografii bude menší v porovnání s chemickými změnami. U stejného chemického složení bude rozhodovat topografie povrchu, avšak u měnícího se chemického složení nemá topografie povrchu tak velký vliv jako u předchozího případu. [27]

3 Experimentální část

3.1 Použité vzorky

V této práci bylo použito celkem 7 vzorků tenkých vrstev TiCN. Vrstvy byly deponovány v Centrální laboratoři aplikované fyziky na Bulharské akademii věd v Plovdivu, a to metodou PVD, konkrétně napařování pomocí obloukového výboje (Cathodic Arc Plasma Deposition). Jako substrát posloužily kuličky o průměru 6,35 mm z oceli třídy 14. Chemické složení je znázorněno v tabulce 1.

Tabulka 1 - Chemické složení substrátu

Obsah prvků (Hm %)			
Si	Cr	Mn	Fe
0,3	2,2	0,3	97,2

3.1.1 Parametry depozice

Všechny povlaky byly nanесeny při teplotě 400 ° C a pracovním tlaku 1,5 Pa. Pro dosažení dobré adheze povlaků k substrátu jsou uloženy kontaktní přechodové vrstvy Ti a TiN.

Tabulka 2 - Parametry depozice jednotlivých vrstev

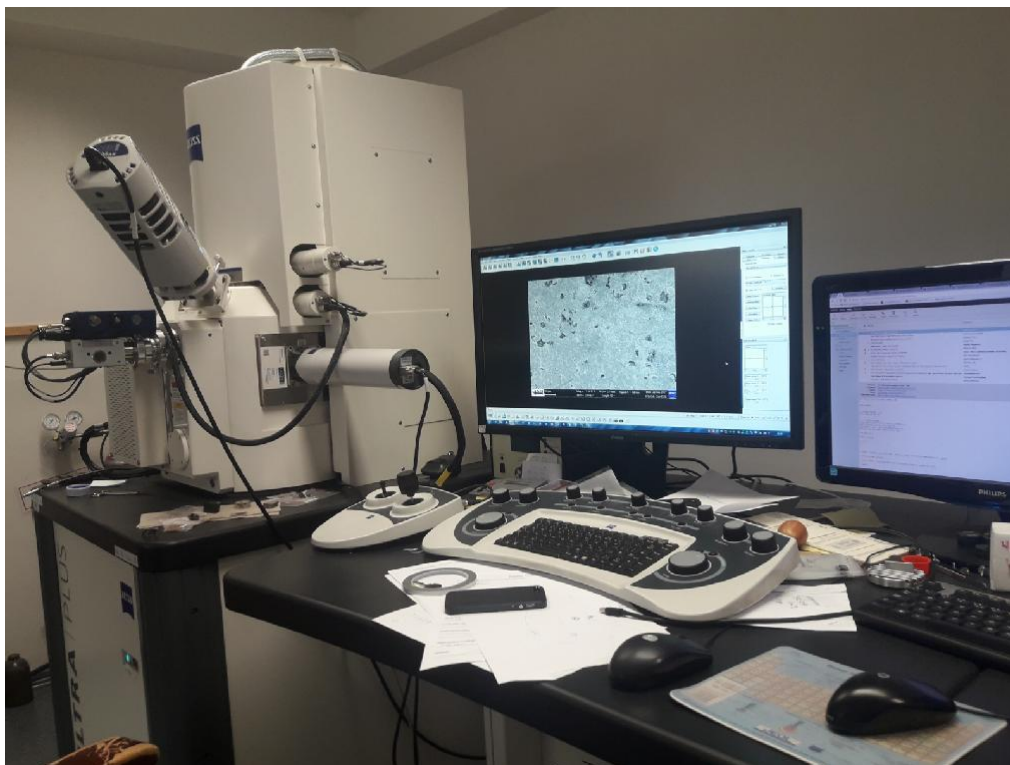
	vz 1	vz 2	vz 3	vz 4	vz 5	vz 6	vz 7
C₂H₂/N₂ [sccm]	20/160	30/140	30/140	30/140	75/150	75/150	93/80
U bias [V]	-40	-40	-60	-40	-40	-40	-40
I arc [A]	85	85	85	125	85	125	85

3.2 Chemické složení

Analýza chemického složení vzorků byla provedena na rastrovacím elektronovém mikroskopu UHR FE-SEM Carl zeiss ULTRA Plus. Tento elektronový mikroskop je zobrazen na obrázku 11. Elektronový mikroskop je vybaven kompletní mikroanalytickou sestavou EDS + WDS + EBSD (Oxford). Dále je vybaven detektorem SE detektorem, EsB detektorem pro snímání BSE dle energie a 4- kvadrantovým AsB

detektorem pro možnost 3D zobrazení. Je možné analyzovat i nevodivé vzorky bez nutnosti úpravy povrchů.

Při analýze chemického složení vzorků bylo urychlovací napětí nastaveno na 7 kV. Tato hodnota se dá interpretovat jako ukazatel hloubky penetrace elektronů. U substrátu byla hodnota urychlovacího napětí nastavena na 15 kV.



Obrázek 11 - Skenovací elektronový mikroskop (Zeiss)

3.3 Biologická interakce s tenkou vrstvou a její měření

3.3.1 Použité bakterie pro experimenty

Pro tyto laboratorní testy jsem vybral dva druhy bakterií. Tou první byla *Escherichia Coli*. Tato bakterie je jedním z nejdůležitějších zástupců střevní mikroflóry. Jedná se o anaerobního parazita, jenž se živí zbytky potravy svého hostitele. Má tvar bičíkaté tyčinkovité bakterie. Řadí se mezi gramnegativní bakterie. Objevil ji v roce 1885 německo-rakouský pediatr a bakteriolog Theodor Escherich. Velmi často se využívá jako modelový organismus pro biologické testy ve zdravotnictví. [29]

Druhou bakterií je *Staphylococcus aureus*. Stafylokoky jsou charakterizovány jako grampozitivní, nesporulující, nepohyblivé a většinou neopouzdržené sférické koky o průměru asi 1 μm . Vyskytují se jednotlivě, ve dvojicích a v nepravidelných shlucích. U člověka se vyskytuje nejvíce na kůži rukou, perinea, kštiny a na sliznici dýchacího a zažívacího traktu. Stafylokoky obecně jsou do značné míry rezistentní k nepříznivým vlivům zevního prostředí. Odolávají zahřátí na 55 °C po dobu 30 minut, vysychání (zvláště za přítomnosti bílkovin přežívají až několik týdnů, např. v zaschlém hnisu) a odolávají vyšším koncentracím NaCl. [30]

3.3.2 Bakteriální suspenze

Obě bakteriální suspenze se vyznačovaly stejnými koncentracemi. Za jako nejvhodnější koncentraci bakterií se ukázala být hodnota 0,1 MCF, což odpovídá hodnotě 3×10^7 KTJ/ml. Absorbance byla 0,026.

3.3.3 Příprava a test se suspenzí

Než se přešlo k samotnému testu se suspenzí, bylo třeba připravit laboratorní pomůcky a média. Nejprve se v autoklávu daly vysterylizovat na 1 hodinu zkumavky, vzorky a pinzety. Poté jsem si připravil kultivační médium, čímž byl roztok agaru (6,3 g/300 ml destilované vody). Dále jsem si připravil roztok chloridu sodného (2,55 g/300 ml destilované vody). Obě média jsem promíchal a dal vysterylizovat do autoklávu na 2,5 hodiny. Tuto přípravu bylo samozřejmě třeba provést jak před první testem s bakteriemi, tak mezi jednotlivými testy s bakteriemi.

3.3.3.1 *Staphylococcus aureus*

Pro obě bakteriální suspenze byl postup prakticky stejný, jen s jednou výjimkou, která bude dále zmíněna. Každý vzorek jsem přendal vysterylizovanou pinzetou do vysterylizovaných zkumavek. Test byl proveden v duplikátech, tedy bylo celkem 16 vzorků. Na každý duplikát vzorku se použila jiná pinzeta, a to kvůli kontaminaci jedné vrstvy druhou. Každá vrstva má jiné parametry, proto by se mohlo stát, že by výsledky byly zkreslené. Do každé zkumavky se napipetovalo 10 ml inokula bakteriální suspenze. Vzorky s inokulem se daly inkubovat na 24 hodin při 37 °C do inkubátoru Incucell BMT Medical technology. Zároveň se provedla kontrola samotného inokula, a to až do 10. ředění. Celý proces ředění je popsán společně se stanovením kultivovatelných mikroorganismů v následující kapitole. Po 24 hodinách se provedlo desítkové ředění, a to do 6. řádu. Následně se vzorky vyndaly sterilní pinzetou,

opláchnuly se v 1 ml fyziologického roztoku a přendaly do nových, sterilních zkumavek. Do těch se přidalo 10 ml fyziologického roztoku a daly se vytřepat na třepáčku Heidolph unimax X1010 po dobu 45 minut při 300 otáčkách za minutu. Z vytřepané suspenze se provedlo desítkové ředění, a to do 4. řádu. Obsah zkumavek, ve kterých byly vzorky, se přefiltroval a vzorky se vložily do Petriho misky s kultivačním gelem a ponechaly 24 hodin v inkubátoru při teplotě 37 °C.

3.3.3.2 *Escherichia Coli*

Test pro tuto bakterii byl totožný s tím rozdílem, že se neprovádělo desítkové ředění před vytřepáním. A po vytřepání se provedlo ředění až do 6. řádu. Ostatní parametry byly totožné.

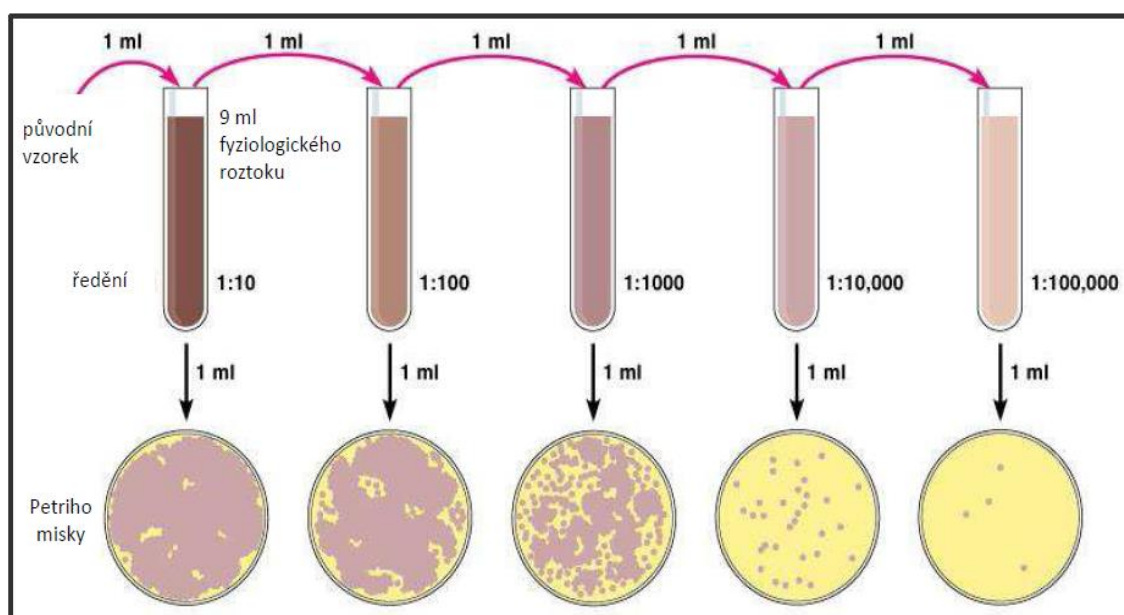
3.3.4 Stanovení kultivovatelných mikroorganismů

Kultivační metodou se stanovuje pouze množství životaschopných a množících se mikroorganismů, řeč je jednotce KTJ (kolonie tvořící jednotky). Kultivační metodou rozumíme izolaci bakterií z prostředí a jejich následnému zředění v agarovém médiu.

Celý test se provádí pomocí tzv. ředění, které jsem zmiňoval výše. Ředí se desítkovou řadou, tedy mluvíme o přenesení 1 ml vzorku do 9 ml sterilního fyziologického roztoku. Takto vzniklý roztok se důkladně promíchá na Vortexu a opět z něj odebereme 1 ml, který se přenese do následující zkumavky s 9 ml sterilního fyziologického roztoku. Tento postup se opakuje dle očekávaného obsahu mikroorganismu ve vzorku, aby se dosáhlo potřebného zředění.

Z takto zředěných zkumavek se na Petriho misky vynesl 1 ml vzorku a zalil 15 ml až 20 ml kultivačního média (roztok agaru) při teplotě přibližně lidského těla, tedy 37 °C. Obsah misky se krouživým pohybem pečlivě promíchal. Pak se obsah misky nechal ztuhnout. Doba mezi nanesením vzorku (nebo jeho zředěním) a přidáním kultivačního média by neměla překročit 15 minut, proto bylo třeba zalívat agarem po určitém počtu vzorků. Stejně tak by se neměl nechat agar více zchladnout, proto musel

být proces rychlý. Celý proces i s ředěním je znázorněn na obrázku 12.



Obrázek 12 - Princip ředění desítkovou řadou [29]

Misky se poté obrátily dnem vzhůru a daly se kultivovat do inkubátoru při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. Ihned po vyjmutí z inkubátoru bylo třeba vyhodnotit počet kolonií na jednotlivých miskách, ale vzhledem k tomu, že jich bylo mnoho, některé bylo třeba uchovávat při teplotě přibližně 4 °C. Takto ponechané misky bylo třeba vyhodnotit do 24 hodin.

3.4 Vyluhovatelnost tenkých vrstev

O tom, zda aplikujeme tenkou vrstvu na kloubní náhrady či na nástroje přicházející do kontaktu s tělem, rozhoduje mnoho parametrů. Jedním ze zásadních parametrů pro tenké vrstvy, které přijdou do kontaktu s tělem, je jejich vyluhovatelnost. Když už aplikujeme určitou vrstvu do těla na například kloubní náhradu, nechceme, aby se přes ni uvolňoval materiál z této kloubní náhrady.

Cílem tohoto testu je simulovat prostředí lidského těla a ponechat vzorky v takovémto prostředí po určitou dobu. Pro tento test byly použity dvě sady vzorků. První sada byla nepoužitá a ta druhá po biologických testech (vzorky kolonizované bakteriemi). Výluh byl odebrán ve třech intervalech, které jsou postačující pro určení vhodnosti vybrané vrstvy. Po prvním a druhém intervalu se médium neměnilo, ale pouze doplnilo, abychom mohli porovnat výsledky. U každého vzorku se odebralo 10

ml a následně doplnilo použitým médiem. V takovémto výluhu se provádí analýza prvků nejvíce zastoupených v substrátu.

3.4.1 Parametry výluhu

- Médium - 0,9% fyziologický roztok (roztok NaCl);
- Doba výluhu - 24 hodin, 14 dní a 30 dní;
- Objem média na vzorek - 50 ml;
- Teplota - 37 °C;
- Míchat - ano;
- Sledované prvky - Fe a Mn.

3.4.2 Princip použité metody pro analýzu

Vzorky byly měřeny metodou ICP OES (optická emisní spektroskopie s indukčně vázanou plazmou) na přístroji fy Perkin Elmer OPTIMA 2000 DV.

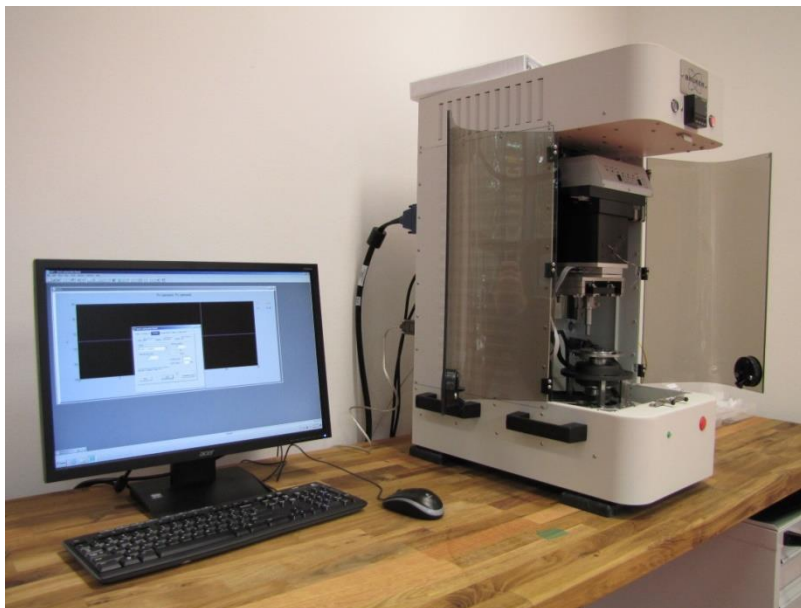
Roztok analytického vzorku je nejprve převeden na horké páry, které obsahují volné atomy a ionty sledovaných prvků. Tyto páry jsou proudem argonu přivedeny do hořáku, ve kterém je za pomoci střídavého vysokofrekvenčního magnetického pole udržováno argonové plazma o teplotě 6000 - 10000 K. V takovýchto podmínkách se rozpouštědlo okamžitě odpaří a zanikají chemické vazby v molekulách přítomných sloučenin. Následně dochází k excitaci elektronů přítomných atomů do vyšších energetických hladin. Excitovaný stav atomu je nestabilní, proto se excitované elektrony vrací zpět na své původní energetické hladiny a při tom emitují světlo o přesně definované vlnové délce, určené energetickým rozdílem obou hladin. [31]

Emitované světlo je poté vedeno na velmi výkonný monochromátor, který rozdělí zachycené světelné záření podle jeho vlnových délek a fotony tohoto rozděleného světla dopadají na citlivý detektor, který převede intenzitu dopadajícího záření na elektrický signál. Intenzita signálu, odpovídající charakteristické vlnové délce světla vznikajícího přechodem energetických stavů analyzovaného prvku, pak odpovídá množství prvku, přítomného v analyzovaném roztoku. [31]

Vlnová délka spektrálních čar pro železo je 259,940 nm. Pro mangan je to 257,610. Toto jsou vlnové délky, které nás při analýze zajímaly nejvíce. [31]

3.5 Kluzné vlastnosti, hodnocení součinitele tření

Hodnocení součinitele tření bylo uskutečněno mezi tenkou vrstvou a keramickou kuličkou z materiálu Si_3N_4 . Samotné měření bylo realizováno na přístroji *CETR UMI Multi-Specimen Test System - Tribometr* znázorněném na obrázku 13.



Obrázek 13 - CETR UMI Multi-Specimen Test System Tribometr

K určení součinitele tření byla použita metoda „Ball-on-Disc“, jejíž princip spočívá v umístění tělíska ve formě nerotující kuličky na povrchu vzorku (ve tvaru disku). Na určité vzdálenosti od středu vzorku je umístěn „Ball“ zatížený předem definovanou silou. Stoleček společně s diskem se otáčí definovanou rychlostí (rpm) a vykonává předem určitý počet otáček nebo určitou délku dráhy. Výsledkem měření je grafická závislost koeficientu tření na délce kluzné dráhy (resp. čas).

Tribologické měření bylo uskutečněno podle normy ASTM G99-95 a při použitém zatížení 5 N. Vrstvy byly nanесeny na substrát z oceli ČSN 19 830. Rychlost pohybu keramické kuličky (Si_3N_4) po povrchu definované podložky (různé typy tenkých vrstev) byla 60 rpm.

Definované podložky byly připevněny k rotujícímu stolečku z důvodu zajištění rovinného (planparalelního) povrchu, po kterém se kulička pohybovala během tribologického experimentu. Délka zkoumané dráhy při vyhodnocení součinitele tření byla 50 m.

4 Výsledky

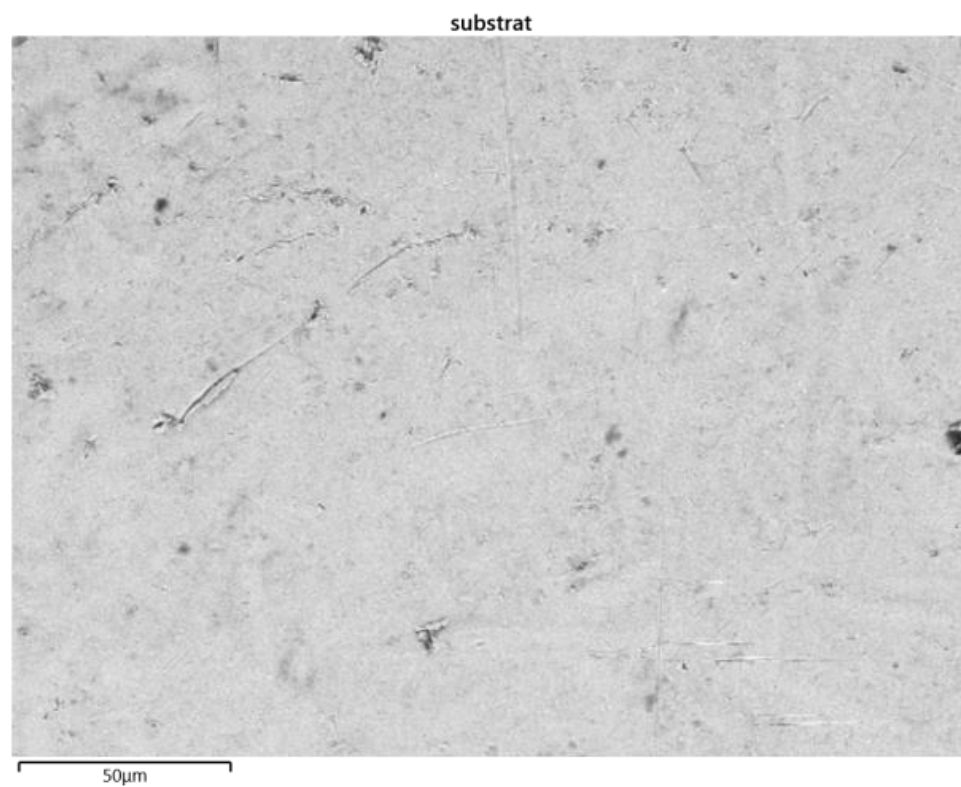
4.1 Chemické složení vrstev

Chemické složení je nejvíce ovlivněno depozičními parametry, nejvíce průtokem plynů. V našem případě se jedná o průtok acetylenu a dusíku. Čím větší průtok acetylenu, tím více uhlíku je ve vrstvě zastoupeno. Stejně tak čím větší průtok dusíku, tím více bude dusíku ve vrstvě. Procentuální zastoupení prvků ve vrstvách TiCN je znázorněno v tabulce 3.

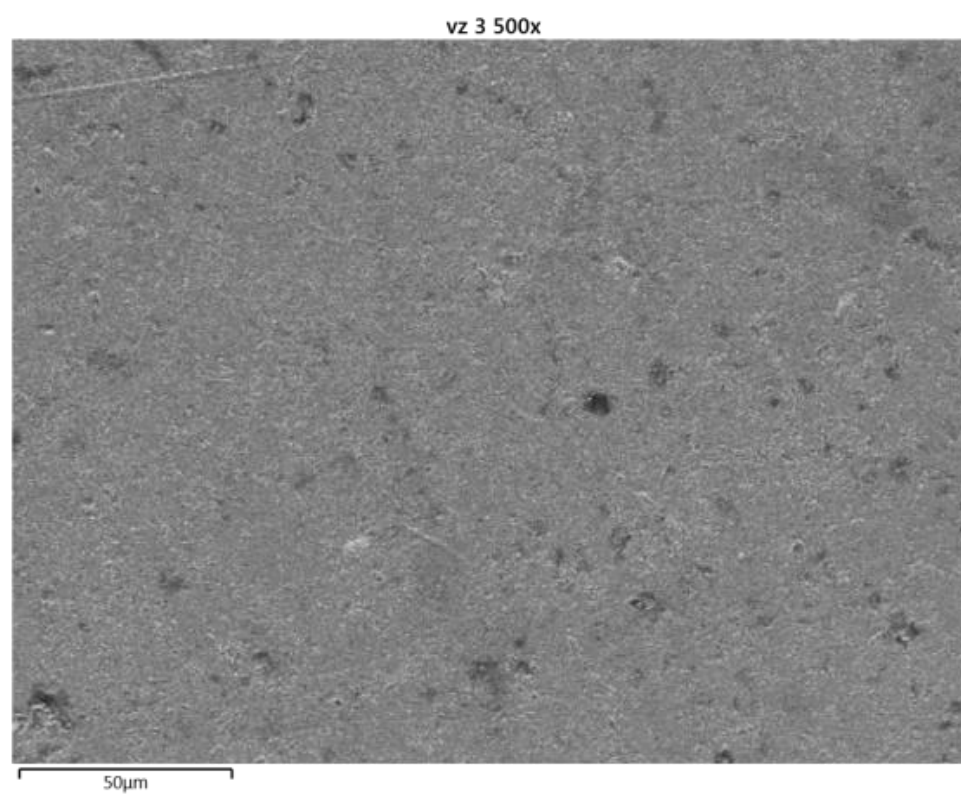
Tabulka 3 - Chemické složení tenkých vrstev

	Obsah prvků (Hm %)			
	C	N	O	Ti
vz 1	7,8	17,2	3,7	71,3
vz 2	16,5	18,6	6,9	57,9
vz 3	14,8	16,4	5,1	63,7
vz 4	16,7	14,8	13,6	54,9
vz 5	25,8	16,5	7,5	50,2
vz 6	22,9	14,7	7,0	55,4
vz 7	35,1	9,0	22,6	33,3

Na obrázku 14 je vzhled povrchu substrátu a na obrázku 15 je vzhled povrchu vzorku 3 z rastrovacího elektronového mikroskopu. Tyto snímky vrstev jsou při 500násobném zvětšení.

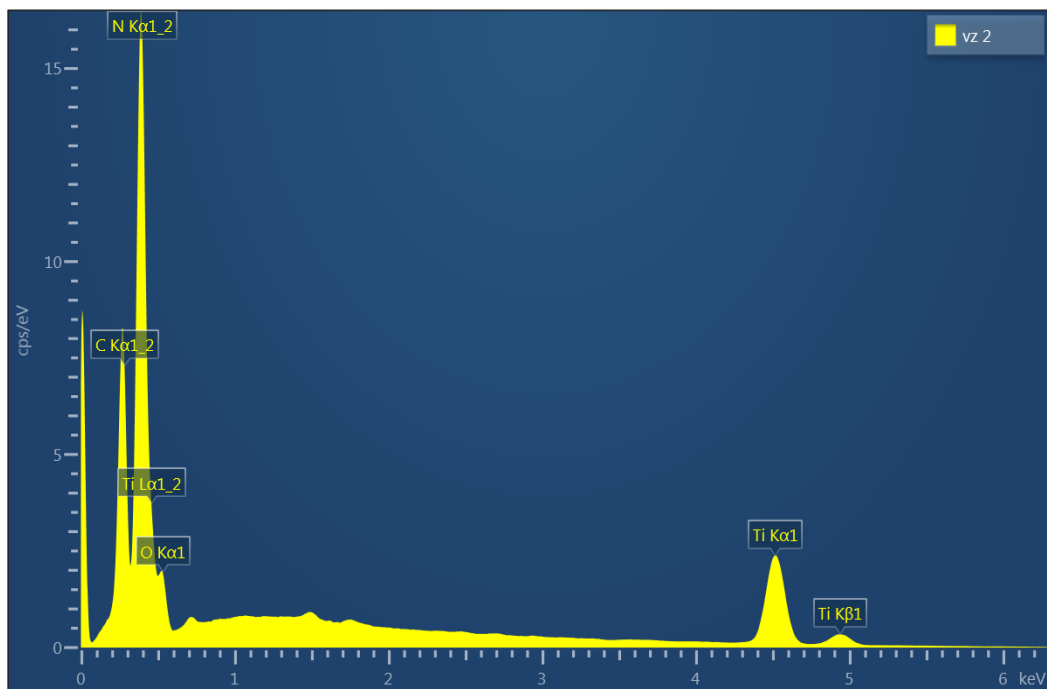


Obrázek 14 - Substrát při 500násobném zvětšení

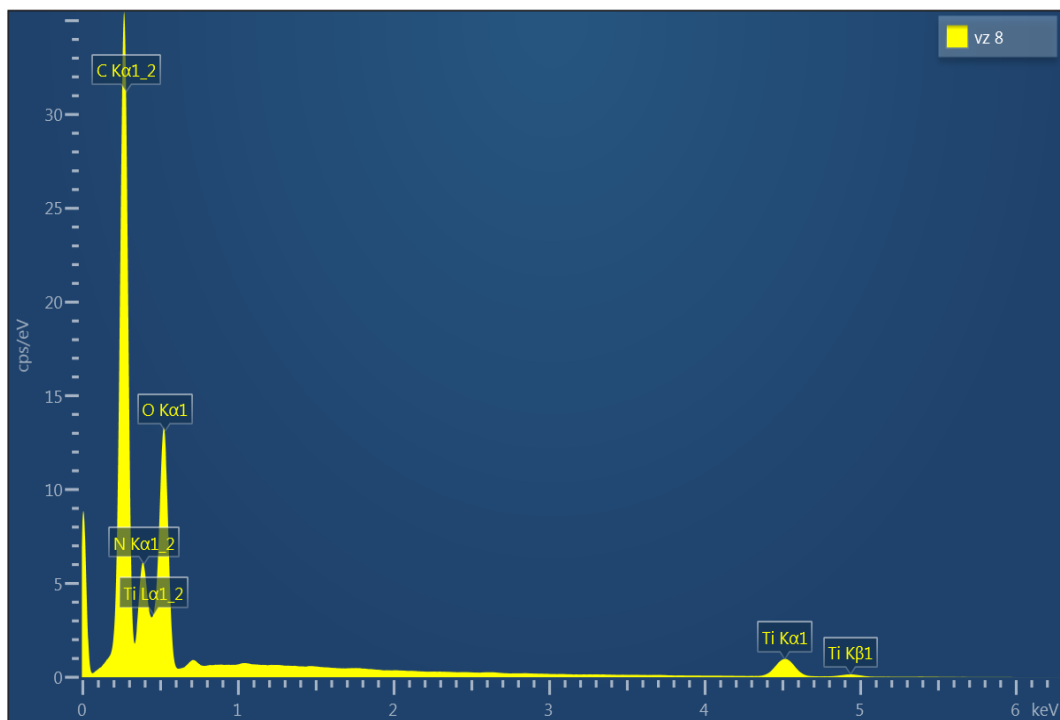


Obrázek 15 - Vzorek 3 při 500násobném zvětšení

Obrázky 16 a 17 ukazují EDS spektra vrstev TiCN. Jedná se o porovnání vrstev vzorků 1 a 7.



Obrázek 16 - EDS spektrum vrstvy TiCN vzorku 1



Obrázek 17 - EDS spektrum vrstvy TiCN vzorku 7

4.2 Biologická interakce s tenkou vrstvou

Jak je popsáno výše, pro tento test jsem vybral 2 druhy bakterií. Tou první je *Staphylococcus aureus*. Před vytřepáním jsem měření prováděl do 6. ředění a po vytřepání do 4. ředění. Spolu se vzorky bylo provedeno i měření kontroly, tedy samotného inokulátu. Druhou bakterií je *Escherichia Coli*.

4.2.1 Kontrola *Staphylococcus aureus*

Kontrola byla provedena dvakrát, v prvním případě se inokulát a jeho ředění nechal inkubovat po dobu 24 hodin a v druhém případě po dobu 48 hodin. Tabulka znázorňuje počet kolonií tvořící jednotku na mililitr pro každé ředění. První tři byly přerostlé a jsou označeny hvězdičkou. Symbol hvězdičky bude dále použit jako "přerostlé" i u dalších hodnot.

Tabulka 4 - Kontrola *Staphylococcus aureus* po 24 hodinách

Ředění (10 [^])	0	-1	-2	-3	-4	-5	-6
KTJ/ml	*	*	*	8420	1120	124	28

Tabulka 5 - Kontrola *Staphylococcus aureus* po 48 hodinách

Ředění (10 [^])	0	-1	-2	-3	-4
KTJ/ml	*	*	*	9320	0

-5	-6	-7	-8	-9
146	15	2	0	0

U jedné z kontrol došlo k chybě při ředění, konkrétně u 4. ředění, protože na Petriho misce nebyla vykultivována ani jedna kolonie. Pravděpodobně nastala chyba při pipetování. Ostatní ředění odpovídají.

4.2.2 *Staphylococcus aureus* před vytřepáním

V tomto měření byly bakterie s vrstvou ponechány v kontaktu po dobu 24 hodin. Dalších 24 hodin se bakterie kultivovaly v kultivačním médiu při teplotě 37 °C.

Tabulka 6 - Počet KTJ/ml u jednotlivých ředění vzorků 1 až 3

Ředění (10 [^])	vz 1 I	vz 1 II	vz 2 I	vz 2 II	vz 3 I	vz 3 II
0	*	*	*	*	*	*
-1	*	*	*	*	*	*
-2	*	*	*	*	*	*
-3	2168	2280	1440	3360	4800	3420
-4	312	386	220	476	444	408
-5	42	76	28	52	67	53
-6	4	9	2	neměřeno	6	4

Tabulka 7 - Počet KTJ/ml u jednotlivých ředění vzorků 4 až 6

Ředění (10 [^])	vz 4 I	vz 4 II	vz 5 I	vz 5 II	vz 6 I	vz 6 II
0	*	*	*	*	*	*
-1	*	*	*	*	*	*
-2	*	*	*	*	*	*
-3	3712	5660	7320	4652	2600	5600
-4	432	716	860	592	324	608
-5	52	71	88	57	36	53
-6	3	8	12	6	3	7

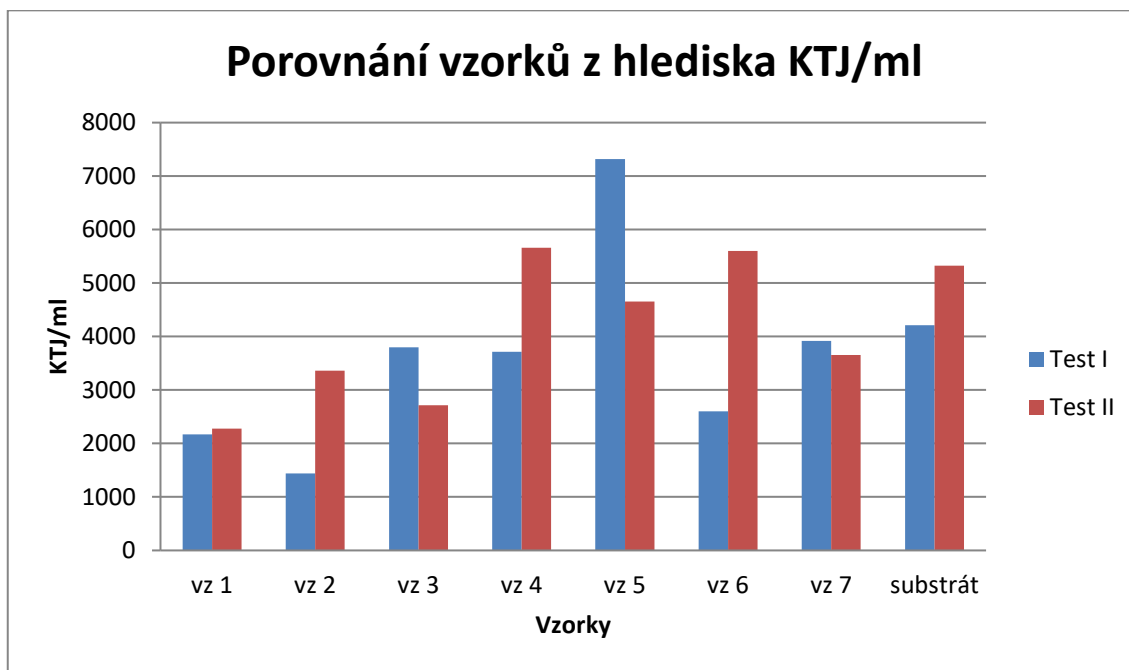
Tabulka 8 - Počet KTJ/ml u jednotlivých ředění vzorku 7 a substrátu

Ředění (10 [^])	vz 7 I	vz 7 II	Subs. I	Subs. II
0	*	*	*	*
-1	*	*	*	*
-2	*	*	*	*
-3	3915	3654	4210	5324
-4	504	306	480	652
-5	49	47	72	74
-6	5	5	7	10

Nejméně kolonizované vzorky jsou 1 a 2. Nejvíce kolonizované jsou vzorky 4 a 5, oba o něco převyšují i samotný substrát.

Prakticky u jediného vzorku 1 se shodují počty KTJ/ml u duplikátů, u ostatních vzorků jsou čísla velmi odlišná. Blízko ke shodě u duplikátů má pouze už jen vzorek 7. Vzhledem k tomu, že duplikáty jednotlivých vrstev byly deponovány za stejných

podmínek, neměly by být počty KTJ/ml tak rozdílné. Jedním z možných vysvětlení této neshody může být různé promíchání zkumavky před nanesením do další zkumavky a na Petriho misku. Na grafu 1 je názorné porovnání jednotlivých duplikátů u 3. zředění.



Graf 1 - Porovnání KTJ/ml u jednotlivých duplikátů při 3. ředění před vytřepáním

Jednotlivé duplikáty se takřka neshodují v KTJ/ml. Shodují se pouze u vzorku 1 a vzorku 7. Tato chyba vznikla s největší pravděpodobností nepřesným pipetováním. V tomto případě je tedy třeba počítat s průměrnou hodnotou KTJ/ml všech duplikátů.

4.2.3 *Staphylococcus aureus* po vytřepání

Po 24hodinovém kontaktu se vzorky promyly fyziologickým roztokem a přendaly do dalších zkumavek s fyziologickým roztokem, které se ponechaly 45 minut na třepačce. Měření se provádělo pouze do 4. ředění, protože se počítalo s mnohem menším zastoupením bakterií. Bakterie se opět kultivovaly po dobu 24 hodin při teplotě 37 °C. V tabulkách 7 až 9 můžeme vidět počet KTJ/ml u jednotlivých vzorků a jednotlivých ředění.

Tabulka 9 - Počet KTJ/ml u jednotlivých ředění vzorků 1 až 3

Ředění (10 [^])	vz 1 I	vz 1 II	vz 2 I	vz 2 II	vz 3 I	vz 3 II
0	35	186	125	208	252	117
-1	8	30	15	61	38	16
-2	1	3	1	3	3	5
-3	0	0	0	0	0	0
-4	0	0	0	0	0	0

Tabulka 10 - Počet KTJ/ml u jednotlivých ředění vzorků 4 až 6

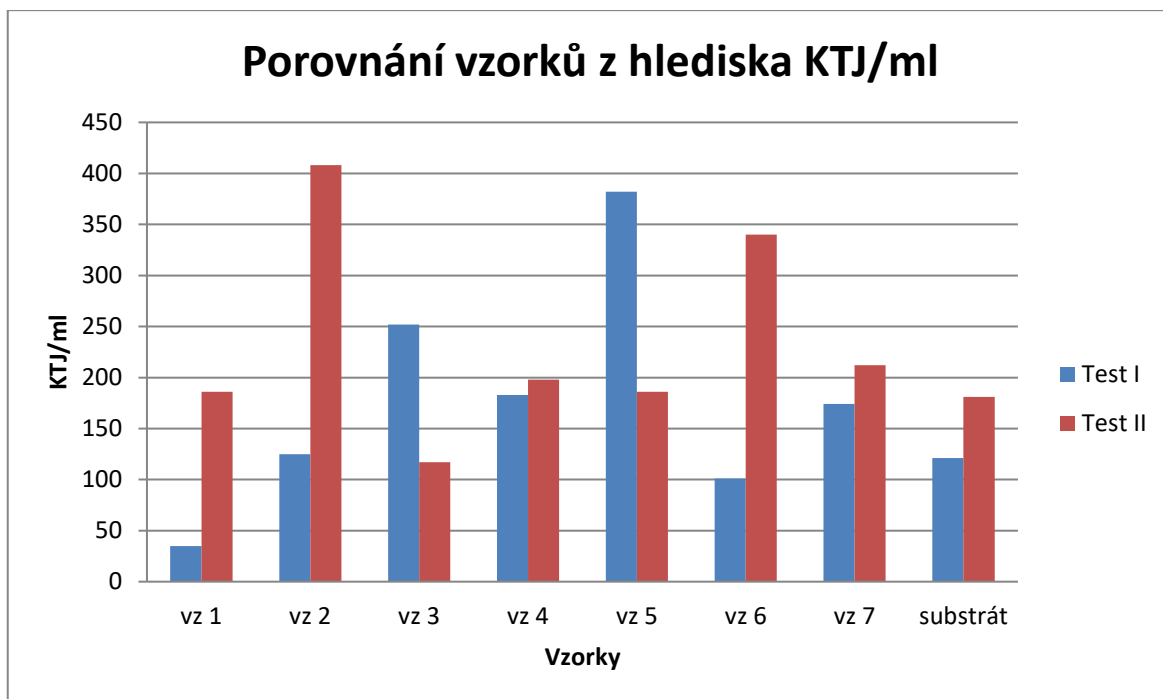
Ředění (10 [^])	vz 4 I	vz 4 II	vz 5 I	vz 5 II	vz 6 I	vz 6 II
0	183	198	382	186	101	340
-1	37	20	33	23	14	44
-2	3	6	17	1	1	7
-3	0	1	1	0	0	0
-4	0	0	0	0	0	0

Tabulka 11 - Počet KTJ/ml u jednotlivých ředění vzorku 7 a substrátu

Ředění (10 [^])	vz 7 I	vz 7 II	Subs. I	Subs. II
0	174	212	121	181
-1	41	31	9	36
-2	2	4	1	1
-3	0	0	0	0
-4	0	0	0	0

V průměru nejméně kolonizovaným vzorkem byl opět vzorek 1. Nejvíce kolonizovaným byl opět vzorek 5. Samotný substrát není zdaleka tolik kolonizovaný oproti ostatním vrstvám. Většina je dokonce v průměru více kolonizována než substrát.

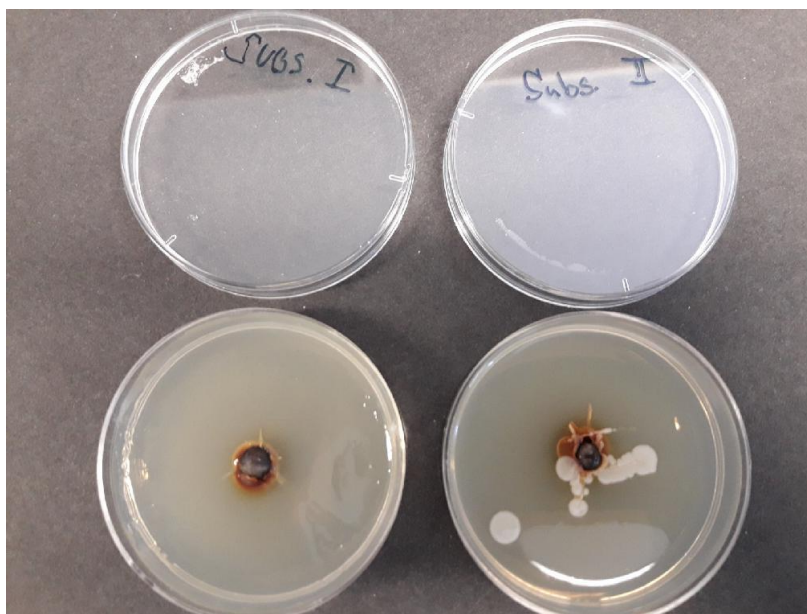
Rozdíly v jednotlivých duplikátech jsou opět značné, podobné hodnoty má opět vzorek 7 a tentokrát i vzorek 4. U vzorku 1 jsme tentokrát dosáhli úplně rozdílných hodnot. Graf 2 znázorňuje porovnání jednotlivých duplikátů u nultého ředění.



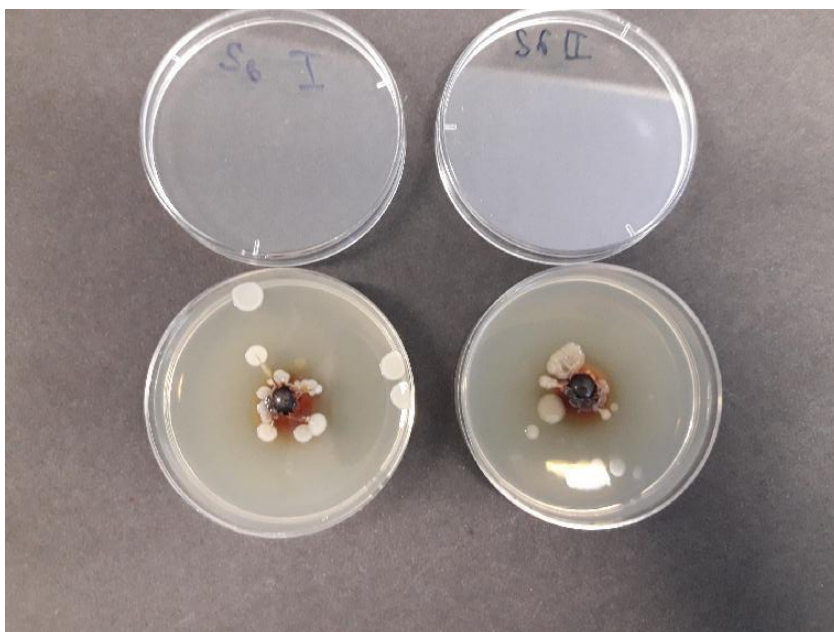
Graf 2 - Porovnání KTJ/ml u nezřaděných duplikátů po vytřepání

4.2.4 *Staphylococcus aureus* z kuličky

Po provedení měření po vytřepání se vzorky vytáhly ze zkumavek a vložily do speciálních Petriho misek s gelem. Následně se nechaly v inkubátoru po dobu 24 hodin při teplotě 37 °C. Na obrázku 17 a 18 je porovnání substrátu a vzorku 5.



Obrázek 18 - Počet kolonií přímo z kuličky substrátu



Obrázek 19 - Počet kolonií přímo z kuličky vzorku 5

Tabulka 12 - Počet KTJ přímo na jednotlivých vzorcích po vytřepání

vz 1 I	vz 1 II	vz 2 I	vz 2 II	vz 3 I	vz 3 II	vz 4 I	vz 4 II
0	9	7	2	2	6	5	18

vz 5 I	vz 5 II	vz 6 I	vz 6 II	vz 7 I	vz 7 II	Subs. I	Subs. II
15	8	1	9	8	2	0	9

Nejvíce kolonizovanými vzorky po obou testech byly v průměru vzorky 4 a 5. Substrát byl opět překvapivě málo kolonizován, společně se vzorky 1 a 3.

4.2.5 Kontrola *Escherichia Coli*

Inokulát se inkuboval po dobu 24 hodin. Ředění bylo provedeno do 9. řádu, avšak už u 5. ředění se na Petriho misce nevyskytovala žádná kolonie.

Tabulka 13 - Kontrola *Escherichia Coli* po 24 hodinách

Ředění (10 ⁿ)	0	-1	-2	-3	-4
KTJ/ml	*	2680	640	156	13

4.2.6 *Escherichia Coli* po vytřepání

Postup měření byl stejný jako u předchozího měření po vytřepání. Jediný rozdíl byl v řádu ředění. Měření bylo provedeno až do 6. ředění. Po 24 hodinách kultivace nebyla na žádné misce ani jedna kolonie, kromě jedné misky se vzorkem 4 u 2. ředění a jedné misky se substrátem u 6. ředění.

Z těchto výsledků nelze s přesností určit, proč se *Escherichia Coli* nevykultivovala v podstatě nikde. Může to být způsobeno topografií povrchu, ale i chemickým složením. Nepředpokládá se, že by se bakterie vůbec na povrch neuchytily. V tomto případě by musel být povrch v podstatě dokonale hladký, aby se adheze bakterií blížila k nule. Dalším faktorem je kultivační teplota *E. Coli*. Tato bakterie se kultivuje v teplotách 10 - 45 °C, ideálně pak v teplotě 37 °C, což je i teplota lidského těla. Pokud by byla teplota v inkubátoru nastavena špatně, nedošlo by vůbec k žádné kultivaci, ani u kontroly, což nenastalo.

Fakt, že by se bakterie vůbec neuchytily na povrchu, vyvrací i výskyt kolonie u 6. a 2. ředění. V předchozích ředění by měl podle tohoto faktu být počet kolonií značně větší, a ne žádný.

4.3 Vyluhovatelnost

Výsledky v tabulkách odpovídají vzorkům nepoužitým. Výsledky u vzorků kolonizovaných bakteriemi prakticky odpovídaly vzorkům nepoužitým, proto lze říci, že bakterie nijak zásadně neovlivňují kvalitu vrstvy a její propustnost pro ionty substrátu. Některé hodnoty byly o trochu větší, některé zase o trochu menší, ale to může být způsobené i chybou měření.

Tabulka 14 - Obsah železa a manganu ve výluhu po 24 hodinách

	Fe (mg/l)	Mn (mg/l)
vzorek 1	9,89	0,057
vzorek 2	13,4	0,062
vzorek 3	6,36	0,051
vzorek 4	7,04	0,053
vzorek 5	7,96	0,052
vzorek 6	10,4	0,065
vzorek 7	9,97	0,057

Tabulka 15 - Obsah železa a manganu ve výluhu po 14 dnech

	Fe (mg/l)	Mn (mg/l)
vzorek 1	137	0,475
vzorek 2	104	0,417
vzorek 3	10,6	0,057
vzorek 4	44,4	0,166
vzorek 5	93,7	0,300
vzorek 6	10,4	0,053
vzorek 7	19,3	0,102

Tabulka 16 - Obsah železa a manganu ve výluhu po 30 dnech

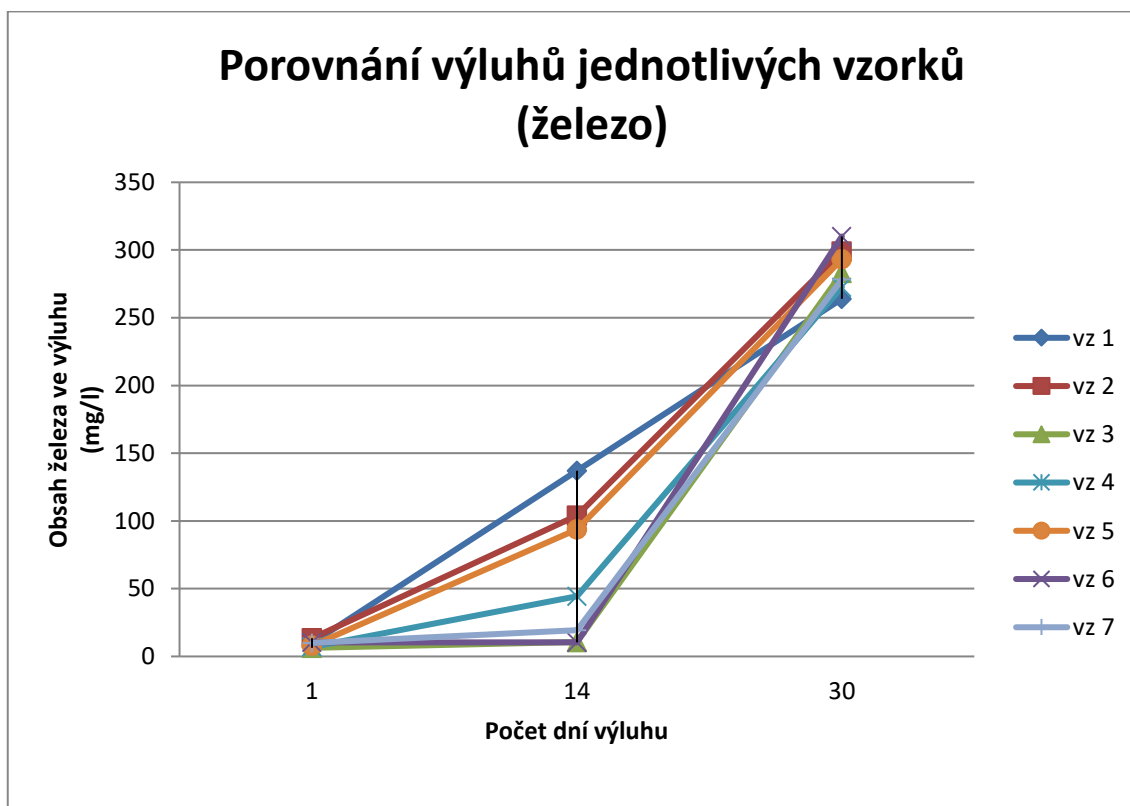
	Fe (mg/l)	Mn (mg/l)
vzorek 1	264	0,816
vzorek 2	299	0,975
vzorek 3	283	0,905
vzorek 4	273	0,882
vzorek 5	293	0,942
vzorek 6	310	0,962
vzorek 7	278	0,892

Již po 24 hodinách (tabulka 14) se ve výluhu objevil menší obsah železa a stopové množství manganu. Rozdíl dvou řádů odpovídá složení substrátu. Z těchto výsledků lze usoudit, že ani jedna z vrstev není moc vhodná pro další aplikace.

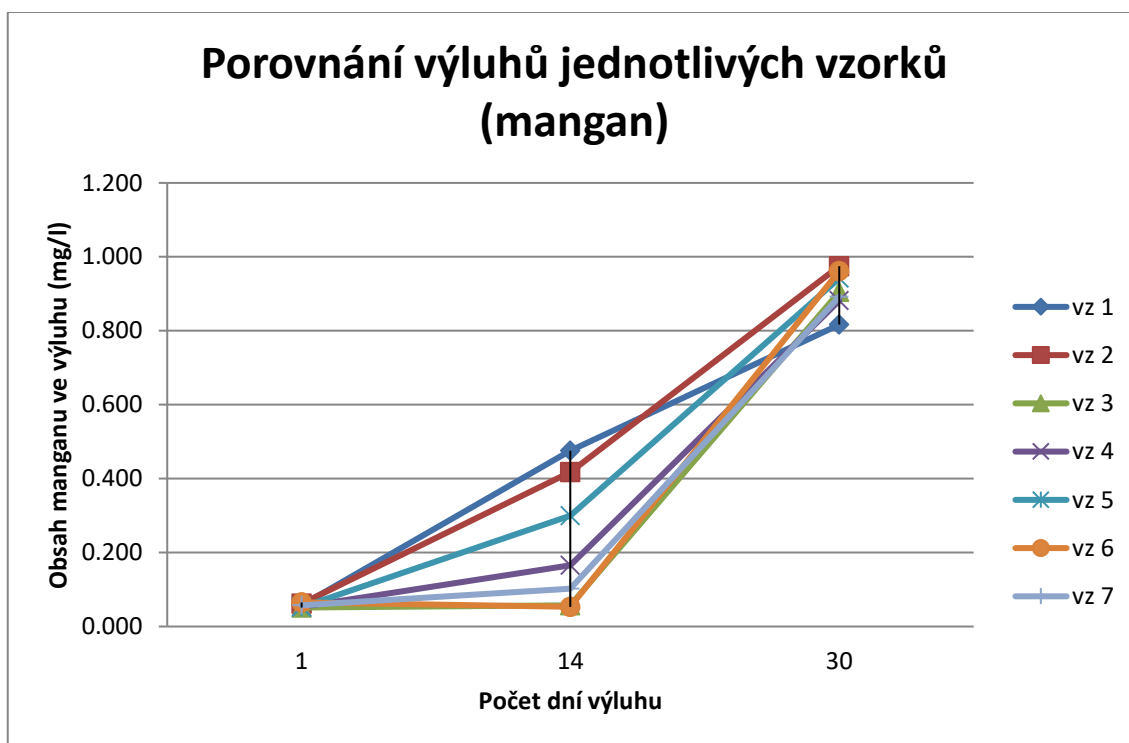
Nepředpokládá se, že by se přes vrstvu nic neuvolňovalo, ale po 24 hodinách by se ve výluhu mělo vyskytovat maximálně stopové množství prvků obsažených v substrátu.

Po 14 dnech (tabulka 15) jsou výsledky výluhů velmi rozmanité. Z těchto výsledků již lze stanovit, která vrstva je nejvhodnější a která naopak nejméně vhodná. U vzorků 3 a 6 jsou výsledky prakticky stejné jako u výluhu po 24 hodinách. Při stanovení obsahu manganu u vzorku S7 zřejmě došlo k chybě měření, protože byl ve výluhu naměřen menší obsah než po 24 hodinách. To může být způsobené špatným protřepáním výluhu před odebráním nebo spíše odchylkou měření. Naopak u vzorků 1, 2 a 5 došlo k velkému nárůstu obsahu železa i manganu, a to dokonce o jeden řád.

Po 30 dnech (tabulka 16) se obsah železa a manganu u všech vzorků prakticky srovnal. U vzorků, které se po 14 dnech zdály být nejvhodnější, došlo k velkému nárůstu obsahu železa a manganu. Naopak u vzorku 1, který byl po 14 dnech nejhorší, došlo k nejmenšímu nárůstu a po 30 dnech se jeví jako nejvhodnější. Z dlouhodobého hlediska jsou tedy nejvhodnější vzorky 1 a 4. Naopak u vzorků 6 a 2 byl ve výluhu zaznamenán největší obsah železa i manganu.



Graf 3 - Porovnání výluhů jednotlivých vzorků pro železo



Graf 4 - Porovnání výluhů jednotlivých vzorků pro mangan

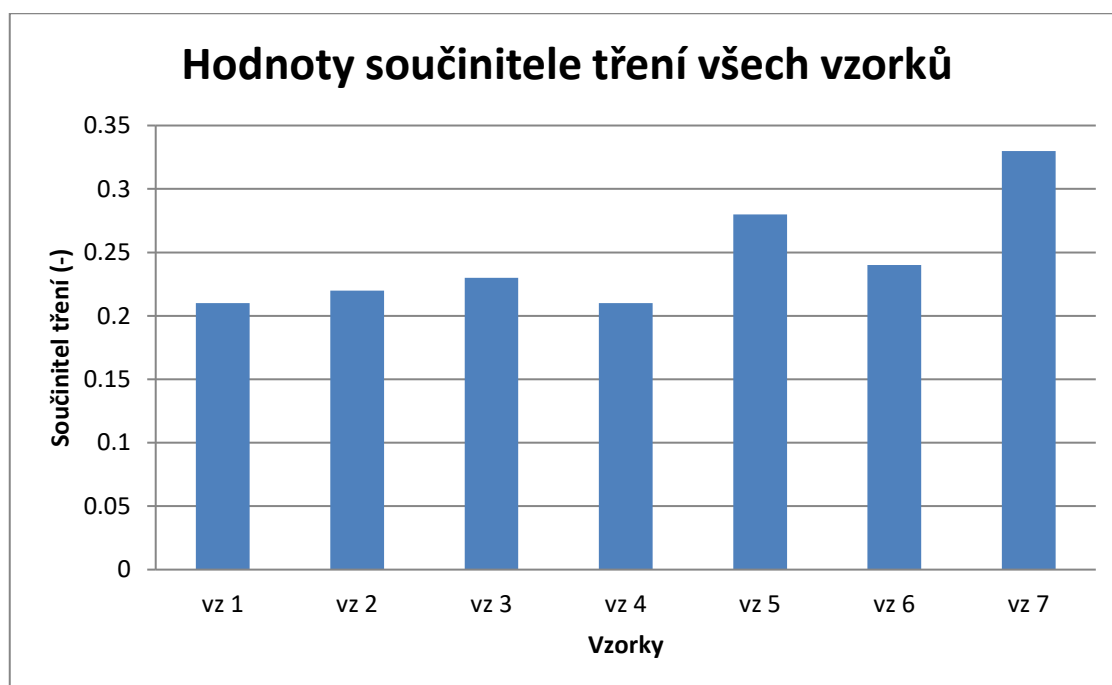
Na grafech 3 a 4 je porovnání výluhů jednotlivých vzorků po 24 hodinách, 14 dnech a měsíci. Graf 3 je pro železo a graf 4 pro mangan. Na obou grafech lze vidět, že obsah prvků byl postupem času větší. Nejvíce rozdílných výsledků bylo dosaženo ve 14 denním výluhu, kde se výsledky u jednotlivých vzorků velmi lišily. U vzorku 1 je uvolňování železa a manganu spíše lineární, u ostatních vzorků je spíše skokové. Po měsíci jsou výsledky u všech vzorků prakticky totožné. Z dlouhodobějšího hlediska tedy není žádná z vrstev vhodnější než ta druhá. Dá se očekávat, že i po delší době bude obsah železa a manganu v jednotlivých výluzích velmi podobný.

4.4 Kluzné vlastnosti, hodnocení součinitele tření

Největší součinitel tření vykazuje vzorek 7, naopak nejmenší vzorky 1 a 4. Všechny hodnoty součinitele tření jsou znázorněny v tabulce 17 a v grafu 5.

Tabulka 17 - Hodnoty součinitele tření jednotlivých vzorků

vzorek	vz 1	vz 2	vz 3	vz 4	vz 5	vz 6	vz 7
Součinitel	0,21	0,22	0,23	0,21	0,28	0,24	0,33
tření (-)	$\pm 0,03$	$\pm 0,03$	$\pm 0,03$	$\pm 0,02$	$\pm 0,06$	$\pm 0,04$	$\pm 0,04$



Graf 5- Hodnoty součinitele tření všech vzorků

5 Diskuze a shrnutí výsledků

Vhodnost a porovnání jednotlivých vzorků z hlediska provedených testů je uskutečněno podle použitých parametrů depozice při nanášení tenkých povlaků. Vrstvy lze rozdělit do tří skupin. Kolonizace bakteriemi jednotlivých vrstev je také provedena dle chemického složení. Na závěr je posouzena vhodnost vrstev pro další aplikace.

Skupina 1

Tabulka 18 - První skupina vzorků

Konstantní	Mění se poměr plynů	Vzorky
U (bias), I arc (A) - 40 V, 85 A	C ₂ H ₂ /N ₂ 20/160 30/140 75/150 93/80	1, 2, 5, 7

Poměr plynů je vzestupně větší se vzorky, tedy vzorek 1 má nejmenší poměr plynů a vzorek 7 největší. S rostoucím poměrem plynů (více acetylenu a méně dusíku) jsou vrstvy více kolonizovány bakteriemi (*Staphylococcus aureus*). Nejvíce kolonizovaný je vzorek 5 (viz graf 1). Nejméně kolonizovaný bakteriemi je vzorek 1.

S rostoucím poměrem plynů se ve 14denním výluhu vyskytovalo méně železa. Klesající tendenci s rostoucím poměrem plynů má, s nepatrným rozdílem, i obsah manganu ve výluhu. Nejméně železa a manganu se ve výluhu vyskytovalo u vzorku 7. Nejvíce železa ve výluhu vzorku 1 a nejvíce manganu ve výluhu vzorku 2. Tento výsledek se ale nezopakoval u 30denního výluhu. Stále platí, že nejméně železa a manganu se vyskytovalo ve výluhu vzorku 1, avšak největší obsah železa a manganu je výluhu vzorků 2 a 5.

Součinitel tření jednotlivých vzorků je rostoucí s rostoucím poměrem plynů. I přesto, že by s větším obsahem uhlíku měl součinitel tření klesat, u těchto vzorků se to neprokázalo. Důvodem může být velké množství kyslíku ve vrstvách, jak je znázorněno v tabulce 3. Naopak s klesajícím množstvím titanu ve vrstvách se zvětšuje hodnota součinitele tření. Největší hodnota součinitele tření byla naměřená u vzorku 7, což může být způsobeno větším množstvím kyslíku ve vrstvě (až 23 hm %). Nejnižší

hodnota součinitele tření byla naměřena u vzorku 1, u kterého bylo množství kyslíku ve vrstvě 3,7 hm %.

Skupina 2

Tabulka 19 - Druhá skupina vzorků

Konstantní	Mění se	Vzorky
poměr plynů C_2H_2/N_2 30/140	U (bias), I arc (A) - 40 V, 85 A - 60 V, 85 A - 40 V, 125 A	2, 3, 4

Ukázalo se, že rozdílné napětí (vz 3) nebo proud (vz 4) při stejném poměru plynů mají vliv na kolonizaci vrstev bakteriemi. Ukázalo se, že čím větší napětí nebo proud, tím více kolonizovaná byla vrstva. Vzorky 2 a 4 byly deponovány při stejném napětí, avšak více kolonizována byla vrstva deponována při větším proudu (vz 4). Vzorky 2 a 3 byly deponovány při stejném proudu, ale vzorek 3 je více kolonizován bakteriemi, což může být zapříčiněno zvýšením napětí při depozici na - 60 V

Použité napětí a proud mají vliv i na obsah železa a manganu ve výluhu. U vzorku 3, který byl deponován s větším napětím a stejným proudem jako vzorek 2, se ve výluhu vyskytovalo méně železa a manganu. Pozitivní vliv na obsah železa a manganu ve výluhu má zvýšení hodnoty proudu z 85 A na 125 A. U vzorku 4 (- 40 V, 125 A) se ve výluhu vyskytovalo méně železa a manganu. Toto porovnání se týkalo 14denního výluhu. U 30denního výluhu se toto tvrzení potvrdilo. Opět se tedy u vzorku 4 vyskytuje ve výluhu méně železa a manganu než u vzorku 2. Vliv zvýšení napětí se projevil u vzorků 2 a 3 tím, že se snížil výskyt železa a manganu ve výluhu u vzorku 3. Po 30 dnech se tento rozdíl v hodnotách nevyskytuje.

Při porovnání vzorků 2, 3 a 4 byla nejnižší hodnota součinitele tření naměřená u vzorku 4 (- 40V, 125A). Největší hodnota součinitele tření byla naměřena u vzorku 3 (- 60 V, 85 A). Zvýšení proudu z 85 A na 125 A vedlo k snížení součinitele tření. Zvýšení napětí z -40 V na -60 V naopak lehce navýšilo hodnotu koeficientu tření.

Skupina 3

Tabulka 20 - Třetí skupina vzorků

Konstantní	Mění se	Vzorky
poměr plynů C_2H_2/N_2 , 75/150	I arc (A)	
U bias (V)	85 A	5,
-40 V	125 A	6

U předchozí skupiny se ukázalo, že použitý proud má vliv na kolonizaci vrstvy bakteriemi. V tomto případě má proud opačný vliv na kolonizaci vrstvy bakteriemi. Vzorek 6 byl deponován při větším proudu, ale je méně kolonizovaný než vzorek 5. V tomto případě může hrát roli větší poměr plynů než u předchozí skupiny.

U vzorku 6, který byl při deponován při větším proudu než vzorek 5, se ve 14 denním výluhu vyskytovalo podstatně méně železa a manganu než u vzorku 5. Tyto výsledky odpovídají skupině 2. Po 30 dnech se ve výluhu vzorku 6 vyskytovalo více železa a manganu než ve výluhu vzorku 5. Nemůžeme tedy na 100 % tvrdit, že by měl proud zásadní vliv na vyluhovatelnost vrstev.

Vzorek 6 (- 40 V, 125 A) má nižší hodnotu součinitele tření než vzorek 5 (- 40, 85 A). U skupiny 2 měl vzorek 4, deponován při stejném proudu jako vzorek 6, nejmenší součinitel tření. Vyšší proud se tedy projevuje i na součiniteli tření, a to pozitivně. Kromě proudu hraje roli i vyšší poměr plynů a obecně zastoupení prvků ve vrstvě, např. titanu.

Vliv chemického složení na kolonizaci povrchu vrstev

Chemické složení má na kolonizaci povrchu bakteriemi velký vliv. Mé vrstvy mají všechny z hlediska prvků stejné složení, avšak kvůli různým poměrům plynů při depozici nemají stejné procentuální zastoupení všech prvků, jak můžeme vidět v tabulce 3. Lze tedy porovnat vliv chemického složení na kolonizaci povrchu bakteriemi.

Nejméně kolonizované vzorky jsou v průměru vzorky 1 a 2. Obě vrstvy obsahují oproti ostatním vrstvám méně uhlíku, vrstva 1 dokonce nejméně (7,8 hm %), a více titanu, vrstva 1 dokonce nejvíce (71,3 hm %). Obě vrstvy také obsahují nejvíce dusíku, nejvíce ve vrstvě 2 (18,6 hm %), avšak zastoupení dusíku je ve všech vrstvách prakticky stejné, tedy kromě vrstvy 7, kde je zastoupení dusíku o polovinu menší než v ostatních vrstvách, proto z těchto údajů nelze určit vliv dusíku. Kromě vrstvy 7 jsou určujícími prvky uhlík a titan, kde je změna ve složení znatelná. Ve vrstvách je kromě titanu, dusíku a uhlíku také kyslík, ale ten nebude v tomto případě zahrnut do porovnání, protože by se ve vrstvách kyslík vyskytovat neměl. Nejvíce kolonizovaná vrstva je v průměru vrstva 5. V této vrstvě je v porovnání s ostatními vrstvami druhé největší zastoupení uhlíku (25,8 hm %) a druhé nejmenší zastoupení titanu (50,2 hm %). Z tohoto lze usoudit, že vyšší zastoupení uhlíku ve vrstvách a nižší zastoupení titanu má pozitivní vliv na kolonizaci bakteriemi.

Nejvíce uhlíku (35,1 hm %) a nejméně titanu (33,3 hm %) obsahuje vrstva 7. U předchozích vrstev se ukázalo, že by dle těchto údajů měla být tato vrstva nejkolonizovanější. Je v průměru jednou z nejkolonizovanějších vrstev, avšak ne nejvíce, tou je právě vrstva 5. Zde může sehrát roli právě zastoupení dusíku (9,0 hm %), které je skoro o polovinu menší než u ostatních vrstev. Z tohoto tedy vyplívá, že čím méně dusíku ve vrstvě, tím méně je vrstva kolonizovaná.

Prognóza vlivu uhlíku a titanu na kolonizaci povrchu bakteriemi se nepotvrzuje u vrstvy 3, která obsahuje více titanu a méně uhlíku než vrstva 2, ale je v průměru více kolonizovaná. V tomto případě se může jednat o chybu při měření.

Vhodnost vrstev TiCN pro další aplikace

Vrstvy TiCN prošly biologickými testy, testy vyluhovatelnosti a také byly zjišťovány jejich kluzné vlastnosti. Biologické testy ukázaly, že všechny vrstvy TiCN nejsou antibakteriální. Pouze vzorky 1 a 2 v těchto testech uspěly. Pro další měření navrhuji optimalizaci depozičních parametrů u zbylých vrstev. Ukázalo se, že vhodnějšími jsou ty vrstvy, které v sobě obsahovaly více titanu. Při testu vyluhovatelnosti došlo pravděpodobně k porušení vrstvy u jednotlivých vzorků, protože obsah železa a manganu byl ve výluhu příliš vysoký. V tomto případě se nepotvrdila výborná adheze TiCN vrstev. Opět bych v tomto případě navrhoval spíše jiné depoziční parametry, než které jsem použil já. Kluzné vlastnosti jsou pro další aplikace dostačující.

Vrstvy TiCN jsou ve zdravotnictví často využívány, avšak je třeba zvolit správný poměr plynů při depozici a také správný proud a bias. Z mých vzorků bych pro další aplikace doporučil vzorky 1 ($\text{C}_2\text{H}_2/\text{N}_2$ - 20/160 sccm, -40 V, 85 A) a 2 ($\text{C}_2\text{H}_2/\text{N}_2$ - 30/140 sccm, -40 V, 85 A).

6 Závěr

V této diplomové práci jsem se seznámil s řadou metod pro tvorbu a hodnocení tenkých vrstev. Vybral jsem vrstvy, které by mohly být vhodné pro aplikace ve zdravotnictví. Pro účely této práce jsem zvolil tenké vrstvy TiCN. Dále jsem navrhl různé parametry depozice tenkých vrstev TiCN, které byly deponovány v Centrální laboratoři aplikované fyziky na Bulharské akademii věd v Plovdivu, a to metodou PVD, konkrétně napařování pomocí obloukového výboje (Cathodic Arc Plasma Deposition).

Otestoval jsem biologickou interakci s povrchem tenkých vrstev. Cílem bylo zjistit, jaké vrstvy budou nejméně kolonizovány bakteriemi. Pro testy jsem použil dva různé kmeny bakterií. Prvním kmenem byl *Staphylococcus Aureus* a tím druhým *Escherichia Coli*. Poté jsem spolupracoval při provedení testu vyluhovatelnosti všech vzorků. Výluh jsem analyzoval z nepoužitých vzorků a i ze vzorků, které byly po biologických testech. U všech vrstev jsem také změřil jejich součinitel tření.

Na závěr jsem podle výsledků provedl diskuzi a vyhodnotil jednotlivé testy podle parametrů depozice. Jednotlivé vzorky jsem rozdělil do skupin podle stejných vybraných parametrů a hodnotil je na základě měnících se jiných parametrů. Také jsem zhodnotil kolonizaci jednotlivých vrstev bakteriemi na základě chemického složení vrstev. A na konec jsem vybral vzorky, které bych doporučil pro další aplikace.

Na základě experimentů se prokázalo, že různé parametry depozice mají do jisté míry vliv na výsledky biologických testů, testů vyluhovatelnosti a tribologické analýzy. Jako nejvhodnější se jeví vzorek 1, který je v průměru nejméně kolonizovaný bakteriemi, ve 30denním výluhu je nejmenší obsah železa a manganu a také má nejnižší součinitel tření. Naopak nejméně vhodným kandidátem je vzorek 5, který je průměrně nejvíce kolonizován bakteriemi. V testu vyluhovatelnosti dopadl jako jeden z nejhorších a byla u něj naměřena větší hodnota součinitele tření ve srovnání s ostatními vzorky. Vliv chemického složení na kolonizaci povrchu bakteriemi se potvrdil jako zásadní. Bakterie se lépe uchycují v těch vrstvách, kde je méně titanu a více uhlíku. Naopak se méně uchycují tam, kde je méně uhlíku a více titanu. Zastoupení dusíku ve vrstvách se na kolonizaci projevuje pozitivně.

Použité zdroje a literatura

- [1] KLUSÁK, O. Biokompatibilní materiály na bázi kovů a jejich využití. Brno: Vysoké učení technické v brně, Fakulta strojního inženýrství, 2010. Vedoucí bakalářské práce: Ing. Lenka Klakurková, Ph. D.
- [2] BIOFABRIS, Biomaterials [vid. 13. 7. 2017] Dostupné z: <http://biofabris.com.br/en/biomaterials/>
- [3] BAKALOVA, Totka, et al. Biocompatibility of Surfaces of TiCN Thin Films. In: *Defect and Diffusion Forum*. Trans Tech Publications, 2016. p. 64-68.
- [4] DALLAS, Panagiotis, et al. Cornet-Like Phosphotriazine/Diamine Polymers as Reductant and Matrix for the Synthesis of Silver Nanocomposites with Antimicrobial Activity. *Macromolecular Materials and Engineering*, 2010, 295.2: 108-114.
- [5] ISLAM, H., et al. Nanostructured TiN thin films suitable for medical applications. In: *Materials forum*. The Institute of Materials engineering Australasia Ltd, 2008.
- [6] BRYCOAT, Titanium Nitride (TiN) Coatings [vid. 14. 7. 2017] Dostupné z: <http://www.brycoat.com/surface-engineering/brycoat-pvd-coating-solutions/brycoat-titanium-nitride-tin-coatings/>
- [7] BRYCOAT, Titanium Carbonitride (TiCN) Coatings [vid. 14. 7. 2017] Dostupné z: <http://www.brycoat.com/surface-engineering/brycoat-pvd-coating-solutions/brycoat-titanium-carbonitride-ticn-coatings/>
- [8] BAKALOVA, Totka, et al. Comparison of mechanical and tribological properties of TiCN and CrCN coatings deposited by CAD. In: *Manufacturing technology*, October 2016. p. 854-858.
- [9] ACREE TECHNOLOGIES INCORPORATED; DLC - Diamond like carbon coatings (vid. 15. 7. 2017), Dostupné z: <http://www.acreetech.com/index.php/products/diamond-like-carbon-coating>
- [10] WARCHOLIŃSKI, B., et al. Arc-evaporated CrN, CrN and CrCN coatings. *Vacuum*, 2008, 83.4: 715-718.

- [11] GILEWICZ, A., et al. Corrosion resistance of CrN and CrCN/CrN coatings deposited using cathodic arc evaporation in Ringer's and Hank's solutions. *Surface and Coatings Technology*, 2016, 299: 7-14.
- [12] EXNAR, P. Příprava nanovrstev oxidu titaničitého a oxidu křemičitého metodou sol-gel [online] [vid. 20. 3. 2018] Dostupné z <https://nanoed.tul.cz/mod/resource/view.php?id=3025>
- [13] KŘÍŽ, A. Tenké vrstvy [online] [vid. 15. 7. 2017]. Dostupné z: https://www.opi.zcu.cz/tenke_vrstvy_sma.pdf
- [14] DAĐOUREK, K., Vybrané technologie povrchových úprav, skriptá TUL, Liberec 2007, ISBN 978-80-7372-168-8.
- [15] HSU, Cheng-Hsun; CHEN, Yu-Dung. A study on the abrasive and erosive wear behavior of arc-deposited Cr–N–O coatings on tool steel. *Thin Solid Films*, 2009, 517.5: 1655-1661.
- [16] TUNA, J., Metody povlakování řezných nástrojů. Brno, 2012. Diplomová práce. Fakulta strojního inženýrství. Vysoké učení technické v Brně. Vedoucí práce Anton Humár.
- [17] INSTITUTE OF MATERIALS AND MACHINE MECHANICS, Physical Vapor deposition [vid. 15. 7. 2017] Dostupné z: http://www.umms.sav.sk/data/files/211_magnetron.jpg
- [18] GRIESSER, Hans J. (ed.). *Thin Film Coatings for Biomaterials and Biomedical Applications*. Woodhead Publishing, 2016.
- [19] SUNTOLA, Tuomo. Atomic layer epitaxy. *Thin Solid Films*, 1992, 216.1: 84-89.
- [20] KŘÍŽ, A. Hodnocení vlastností tenkých vrstev nitridu kovu [online] [vid. 22. 7. 2017]. Dostupné z: https://www.opi.zcu.cz/HODNOCENI_VLASTNOSTi_TENKYCH_VRSTEV_%20NITRIDU_KOVU.pdf
- [21] YAN, Wenyi; O'DOWD, Noel P.; BUSSO, Esteban P. Numerical study of sliding wear caused by a loaded pin on a rotating disc. *Journal of the Mechanics and Physics of Solids*, 2002, 50.3: 449-470.

- [22]Elektronová mikroskopie, VŠCHT, dostupné z http://old.vscht.cz/nmr/mol_model_bioinfo/lekce/mikroskopie.pdf
- [23]BARRANDE I. laborař elektronové mikroskopie, [vid. 16. 7. 2017] Dostupné z: <http://barrande.nm.cz/index.php?p=6>
- [24]ZEISS, AsB Detector [vid 21. 3. 2018] Dostupné z: <https://www.zeiss.com/content/dam/Microscopy/Products/electron-microscopes/upgradesEM/pdf/upgradeinfo-asb-detector.pdf>
- [25] ZEISS, EsB Detector [vid 16. 7. 2017] Dostupné z: <https://www.zeiss.com/content/dam/Microscopy/Products/electron-microscopes/upgradesEM/pdf/upgradeinfo-esb-detector.pdf>
- [26]JOHNSON MATTHEY, EsB Detector [vid. 16. 7. 2017] Dostupné z: <http://www.technology.matthey.com/images/articles/58/2/Kuo-58-2-Apr14-f3.jpg>
- [27] ANSELME, K., et al. The interaction of cells and bacteria with surfaces structured at the nanometre scale. *Acta biomaterialia*, 2010, 6.10: 3824-3846.
- [28]SANDLE, Tim. Bacterial Adhesion: An Introduction [vid. 5. 8. 2017] Dostupné z: <http://www.ivtnetwork.com/sites/default/files/u433/Biofilm-Formation.jpg>
- [29] COUFALOVÁ, A., Posouzení vhodnosti uhlíkové nanostruktury pro kolonizaci bakteriální populací. Liberec, 2016. Bakalářská práce. Fakulta mechatroniky, informatiky a mezioborových studií. Technická univerzita v Liberci. Vedoucí práce: Mgr. Petra Rosická.
- [30]TOXIKON, Staphylococcus Aureus [vid. 16. 8. 2017] Dostupné z: http://www.biotox.cz/toxikon/bakterie/bakterie/staphylococcus_aureus.php
- [31]FITZSIMMONS, Jonathan. The Royal Society of Chemistry, 2015. Analytical method Validation: ICP-OES [vid. 6. 8. 2017] Dostupné z: <http://www.rsc.org/suppdata/c5/ja/c5ja00419e/c5ja00419e1.pdf>